

THESES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir le grade de

Docteur ès-Sciences

par

Jean-Paul BECK

Licencié ès Sciences

Assistant à la Faculté des Sciences

Première thèse

**Contribution à l'étude des Acides Ribonucléiques
de la Cellule Hépatique chez le Rat Normal
ou Hypophysectomisé**

Deuxième thèse:

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 6 Janvier 1969 devant la Commission d'Examen

MM. F. STUTINSKY	Président
P. MIALHE	Examineur
J.-P. EBEL	,
A. JOST	Membre invité
A. BOER	,



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553609_0006

THESES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir le grade de

Docteur ès-Sciences

par

Jean-Paul BECK

Licencié ès Sciences

Assistant à la Faculté des Sciences

Première thèse

**Contribution à l'étude des Acides Ribonucléiques
de la Cellule Hépatique chez le Rat Normal
ou Hypophysectomisé**

Deuxième thèse:

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 6 Janvier 1969 devant la Commission d'Examen

MM. F. STUTINSKY	Président
P. MIALHE	Examineur
J.-P. EBEL	,
A. JOST	Membre invité
A. BOER	, ,



Doyen: Professeur J.H.VIVIEN

Doyens Honoraires: A.KIRRMANN, P.LACROUTE, H.J.MARESQUELLE,
G.MILLOT.

Professeurs Honoraires: P.DE BEAUCHAMP, L.BOISSELET, H.CARTAN,
G.CERF, C.CHABAUTY, A.CHRETIEN,
J.DENY, Ch.EHRESMANN, M.FRECHET,
Mle S.GILET, A.HEE, R.HOCART,
A.KIRRMANN, G.LEMEE, P.L'HERITIER,
A.LICHNEROWICZ, L.NEEL, Ch.SADRON,
E.TERROINE, H.VILLAT, H.WEISS,
Et.WOLFF, J.YVON.

Maître de Conférences Honoraire: R.WEIL.

Professeurs:

H.J.MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
H.FORESTIER	T.	Chimie générale
J.ROTHE	T.	Physique du Globe
P.LACROUTE	T.	Astronomie
J.H.VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A.MAILLARD	T.	Physicochimie du Pétrole
S.GORODETZKY	T.	Physique générale et Phy- sique nucléaire
L.SACKMANN	T.	Mécanique des Fluides
J.BYE	T.	Chimie Physique
R.LOMBARD	T.	Chimie organique
Mle M.PEREY	T.	Chimie nucléaire
S.GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P.JOLY	T.	Biologie générale
H.BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P.CUER	T.	Physique générale et physique corpusculaire
G.MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R.LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H.SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R.ROHMER	T.	Chimie minérale
Mle A.GAGNIEU	T.T.P.	Botanique
S.NIKITINE	T.	Physique générale
F.STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B.WURTZ	T.T.P.	Chimie biologique
J.BRENET	T.	Electrochimie
G.OURISSON	T.T.P.	Chimie
A.COCHÉ	T.T.P.	Physique nucléaire
R.CERF	T.	Physique générale
J.FRENKEL	T.T.P.	Mathématiques
P.TAGLANG	T.	Physique

J.P.LONCHAMP	T.T.P.	Physique
A.DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J.B.DONNET	T.T.P.	Chimie Physique
R.ARMBRUSTER	T.T.P.	Physique
A.ROCHE	T.T.P.	Physique du Globe
L.HIRTH.....	T.	Microbiologie
A.SIGOT	P.S.C.	Zoologie
A.FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A.GALLMANN	T.T.P.	Physique
P.MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale
J.P.EBEL	T.	Chimie biologique
J.PARROD	T.T.P.	Chimie
R.WEY	T.T.P.	Chimie
Mme D.MAGNAC	T.T.P.	Physique
M.DAUNE	P.S.C.	Physique
J.P.ADLOFF	T.T.P.	Chimie nucléaire
D.BERNARD	T.T.P.	Méthodes mathématiques de la physique
E.DANIEL	T.	Physique expérimentale
P.CHEVALLIER	T.	Physique
J.GREMILLARD	T.T.P.	Mécanique des Fluides
P.CARTIER	T.	Mathématiques
G.REEB	T.	Topologie
R.CHAUVIN	T.	Psychophysiologie
J.WUCHER	P.S.C.	Physique
Mme BRINI M.	P.S.C.	Chimie
R.BARO	P.S.C.	Physique
H.DURANTON	P.S.C.	Botanique
R.WEISS	T.T.P.	Chimie
P.FEDERLIN	T.T.P.	Chimie
J.LERAY	P.S.C.	Physique
J.P.SCHWING	P.S.C.	Chimie
M.SIESKIND	P.S.C.	Physique
G.MONSONEGO	T.	Physique théorique
P.GABRIEL	T.T.P.	Mathématiques
C.WIPPLER	T.	Physicochimie des Hauts Polymères industriels
P.A.MEYER	T.T.P.	Mathématiques
G.WEILL	P.S.C.	Physique
J.M.BLOCH	T.	Chimie
A.CLAUSS	P.S.C.	Chimie
E.FOLLENIUS.....	P.S.C.	Zoologie
J.LUCAS	P.S.C.	Géologie
J.J.THIEBOLD	P.S.C.	Biologie animale
G.GLAESER	T.	Mathématiques
J.H.WEIL	P.S.C.	Chimie biologique
D.FOATA	P.S.C.	Mathématiques

Professeurs associés: A.BANDERET (E.A.H.P.) - R.CLELAND (Physique)
G.PEROLD (Chimie) - J.SAMPSON (Mathématiques)

Maîtres de Conférences:

H.DANANPhysique
Mme WINTER Chr.Physique
J.P.EBERHARTMinéralogie
Mme D.CAGNIANTChimie
X.FERNIQUEMathématiques
J.STREITHChimie
F.GAUTIERPhysique propédeutique
G.SUTTERPhysique électronique
J.M.LEHNChimie
Cl.ROBERTPhysique
Fr.LACROUTEBiologie végétale
A.GIRARDIEBiologie animale
M.GOUNOTBotanique
J.DEHANDChimie minérale
J.PRADINESMathématiques
F.BECKERPhysique mathématique
M.KAROUBIMathématiques
A.MIGNOTMathématiques appliquées
R.VOLTZPhysique théorique
A.MICHARDGéologie
J.M.GIRAUDMathématiques
Y.BOULANGERChimie biologique
D.DACUNHA-CASTELLEMathématiques
J.P.BRETAGNOLLEMathématiques

Maîtres de Conférences associés:

V.AVANISSIAN (Mathématiques) - J.APSIMON (Chimie) -
R.CAIROLI (Mathématiques) - E.DADE (Mathématiques) -
H.GOLDWHITE (Chimie) - G.LETTA (Mathématiques)-
G.RINEHART (Mathématiques) - M.SZYMONA (Chimie biologique).

Secrétaire général de la Faculté: G.SAINT-PE.

INTRODUCTION GENERALE

De grands progrès ont été réalisés au cours des vingt dernières années dans le domaine de l'endocrinologie. De nombreux problèmes ont été élucidés dans la connaissance de la synthèse et de la sécrétion des hormones au niveau des organes de production ou de stockage et dans la compréhension des effets spécifiques au niveau des récepteurs tissulaires et des corrélations humorales et nerveuses. Mais il y a peu d'années encore de grands obstacles se présentaient à la conception des mécanismes d'action des hormones à l'échelle cellulaire et moléculaire. Malgré l'importance des glandes endocrines dans le maintien de la vie normale et la gravité des désordres métaboliques qui suivent le dérèglement hormonal, il n'existait, en effet, aucune explication satisfaisante du mode d'action des hormones, notamment au niveau du contrôle de la synthèse protéique.

L'hypothèse la plus ancienne formulée à ce sujet (HÖBER, 1915) s'appuyait sur l'idée d'une action directe sur la membrane cellulaire par le jeu des modifications sélectives de la perméabilité aux aminoacides et à d'autres précurseurs métaboliques.

Par la suite, une autre hypothèse basée sur l'activation par les hormones de certains systèmes enzymatiques fut suggérée par analogie avec les mécanismes d'action des vitamines. Pour les vitamines, comme pour les hormones, de très faibles doses exercent des effets importants et il était tentant de rattacher les hormones aux enzymes, sachant que certaines vitamines sont des constituants de coenzymes. Mais jusqu'à présent, mis à part des effets non spécifiques, il n'a pas été possible de mettre en évidence une action des hormones sur des systèmes enzymatiques purifiés "in vitro" ou sur des préparations réellement acellulaires ; de plus, il semble que l'action des hormones soit liée à la présence de certaines structures cellulaires.

La dernière hypothèse formulée en 1963 par KARLSON impliquant une action primaire des hormones au niveau du génome par activation de la transcription du DNA en RNA messenger, découle de deux événements importants de la biologie moderne survenus à peu près simultanément en

1961 : le premier concerne la théorie de la régulation de la synthèse protéique formulée par JACOB et MONOD et faisant intervenir le concept de RNA messenger comme véhicule de l'information génétique ; le deuxième est la découverte par CLEVER et KARLSON de l'effet primaire de l'ecdysone au niveau des chromosomes polythéniques des glandes salivaires de la larve de *Chironomus tentans*. Cette hormone stéroïde de la glande prothoracique déclenche en premier lieu le phénomène du "Puffing" qui est une sorte de gonflement des anneaux de Balbiani. Ces régions ou "Puffs" sont alors le siège d'une synthèse active de RNA. Ces données permirent à KARLSON de proposer le schéma suivant pour expliquer une nouvelle possibilité d'action des hormones à l'échelle cellulaire :

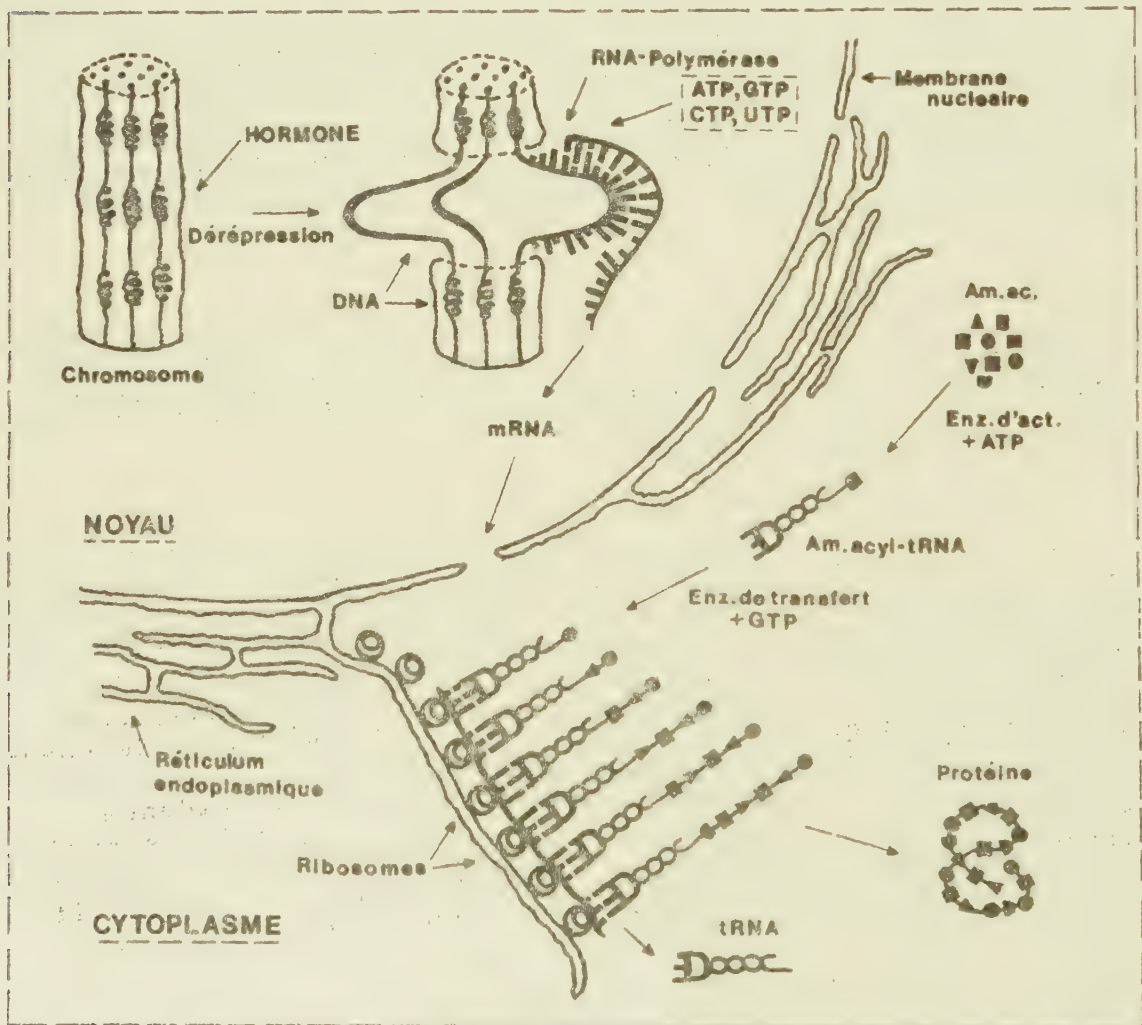


Schéma ! : Représentation du mécanisme d'action des hormones, suivant KARLSON.

Selon cette hypothèse, les hormones agiraient directement sur les chromosomes en provoquant une déspiralisation de la double hélice du DNA dont le "Puffing" serait la conséquence. Cette action pourrait correspondre à un mécanisme de dérégulation de la transcription se traduisant par une activation de la synthèse de RNA messenger qui, après passage du noyau au cytoplasme, se lie aux ribosomes et induit la synthèse des protéines en présence de RNA de transfert dont le rôle est de fixer et de transporter les aminoacides jusqu'aux sites de synthèse constitués par les polysomes.

Au cours des dernières années, un grand nombre de travaux ont été consacrés à l'étude de l'action des hormones sur la synthèse des RNA. Quelques résultats expérimentaux semblent confirmer cette hypothèse, mais ils sont tous relatifs à l'action d'hormones stéroïdes, comme l'ecdysone elle-même. Ainsi MUELLER et coll. (1961) ont montré que le premier effet de l'oestradiol au niveau de l'utérus consistait dans l'augmentation de la synthèse de RNA et de protéines; les modifications de perméabilité et l'enrichissement en eau des cellules ne surviennent que par la suite. FEIGELSON et coll. (1962) ont constaté que le cortisol provoquait une activation de la synthèse de RNA nucléaire chez le rat, précédant l'augmentation de la tryptophane-pyrrolase dans le foie. LIAO et WILLIAMS-ASHMAN (1962) ont montré que la synthèse protéique dans un système acellulaire de prostate était augmentée, si les animaux avaient reçu préalablement des injections de testostérone. Enfin, selon des recherches plus récentes de SEKERIS (1967), l'addition de cortisol dans le milieu d'incubation de noyaux isolés de foie de rat provoquerait une stimulation de l'activité de la RNA-polymérase et une augmentation de la synthèse du RNA nucléaire. Le RNA extrait de ces noyaux purifiés serait capable de stimuler "in vitro" dans un système acellulaire ribosomal de foie de rat la synthèse de la tyrosine-transaminase.

Si cette hypothèse de l'action primaire des hormones au niveau de la transcription du DNA en RNA messenger peut aujourd'hui s'appuyer sur un certain nombre de résultats expérimentaux, il subsiste cependant plusieurs problèmes qui n'ont pas encore été éclaircis. On ne sait pas de quelle façon une hormone peut induire ou activer spécifiquement la transcription. Il semble que dans le noyau l'hormone se fixe d'abord sur un récepteur spécifique

(JUNGBLUT, 1967). L'idée a été émise que le récepteur pourrait être un constituant de la chromatine ayant la propriété d'un répresseur. La fixation spécifique allostérique de l'hormone sur la molécule réceptrice entraînerait la dérégulation d'un ou de plusieurs opérons.

Mais il est possible que le contrôle hormonal s'effectue à d'autres niveaux que celui de la transcription. Il a été postulé (GEORGIEV, 1966) qu'une régulation pourrait s'effectuer au niveau du passage du mRNA du noyau au cytoplasme. En effet, une fraction seulement du RNA synthétisé dans le noyau semble migrer vers le cytoplasme. On ne sait d'ailleurs pas si le RNA messenger chez les organismes supérieurs quitte le noyau à l'état de molécule libre ou s'il est lié à des particules protéiques (informosomes) ou à des sous-unités des ribosomes. Il est possible aussi que des régulations hormonales interviennent directement dans le cytoplasme au niveau de la traduction du code, par exemple des tRNA dont l'anticodon est directement impliqué dans le déchiffrage du message porté par le mRNA. Nous avons montré avec C. MIALHE (1966) que le blocage de la synthèse des RNA par l'actinomycine D n'empêchait pas la stimulation de la synthèse de la corticostérone surrénalienne par l'hormone corticotrope.

Ainsi, nous avons orienté, dès 1962, nos recherches dans la direction d'une étude des mécanismes de l'action hormonale à l'échelle moléculaire et, avec beaucoup d'optimisme, nous nous sommes fixés comme programme de départ l'étude de l'hormone peptidique somatotrope hypophysaire dans son action sur la synthèse protéique au niveau du foie. L'optimisme venait surtout du fait qu'à cette époque, il semblait, à la suite des travaux de GROS et coll. sur *E. coli*, que l'on puisse assez facilement isoler les RNA messagers grâce à leur propriété de marquage rapide. Nous pensions alors mettre ce critère à profit pour isoler et analyser les RNA messagers du foie de rat après suppression des effets de l'hormone de croissance, c'est-à-dire après hypophysectomie puis après traitement des animaux par l'hormone somatotrope, en comparant ces RNA messagers à ceux du foie de l'animal normal.

Mais, de nombreuses difficultés apparurent très rapidement aussi bien d'ordre matériel que sur le plan des idées et de la conception des recherches expérimentales. Les techniques nouvelles et complexes de la Biologie Moléculaire avaient été mises au point et décrites pour le matériel bactérien et ne pouvaient pas s'appliquer directement aux tissus animaux. Cela nous a demandé un long et difficile travail d'adaptation de certaines méthodes au matériel animal. L'isolement du RNA à partir des noyaux hépatiques s'est avéré particulièrement compliqué du fait de l'instabilité de ces RNA et de la présence de quantités importantes de DNA qui les accompagnaient.

Grâce à une collaboration interdisciplinaire efficace entre le laboratoire de Physiologie et celui de Biochimie, nous sommes arrivés progressivement à développer le programme de nos recherches. Plus récemment, l'intérêt accordé à notre équipe par M. le Doyen VIVIEN et l'attribution de moyens nouveaux dans le cadre du Département des Applications Biologiques du Centre Nucléaire de Strasbourg ont grandement contribué à l'avancement de nos travaux.

Une première étape de nos recherches a consisté à isoler et à analyser les RNA cytoplasmiques et nucléaires du foie de rats normaux et hypophysectomisés. Un effort particulier a été réalisé en ce qui concerne les RNA nucléaires à renouvellement rapide, au sujet desquels il existait de nombreux problèmes dont beaucoup ne sont pas encore résolus.

Nous avons ensuite étudié les activités de synthèse protéique dans le foie, en l'absence des hormones hypophysaires et après traitement des animaux par l'hormone somatotrope. Ces études ont été entreprises à l'échelle subcellulaire, à l'aide de systèmes acellulaires microsomeux et ribosomiaux homologues.

Dans une dernière étape, nous avons entrepris, en collaboration étroite avec le Laboratoire de Chimie Biologique, des recherches dans un domaine encore inexploré, celui de l'action possible des hormones au niveau des RNA de transfert.

Avant d'exposer nos résultats, nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur STUTINSKY. Tout en exerçant les fonctions d'assistant dans son service, nous avons pu effectuer nos recherches au Laboratoire de Physiologie Animale. Nous lui sommes particulièrement reconnaissant de nous avoir laissé une grande initiative dans cette étude, pour laquelle il nous a prodigué conseils et encouragements.

Notre profonde gratitude s'adresse à Monsieur le Professeur EBEL. Les nombreux conseils qu'il nous a apportés pour la partie biochimique ainsi que les directives et les longues discussions au cours de la rédaction de ce mémoire, nous ont été extrêmement précieux.

Monsieur le Professeur JOST, Directeur du Laboratoire de Physiologie Comparée de la Faculté des Sciences de Paris, nous a fait le grand honneur de participer à notre jury. Nous sommes extrêmement sensible à cette marque d'intérêt pour ce travail et nous lui exprimons nos remerciements respectueux.

Nous tenons à exprimer notre gratitude à Monsieur le Docteur BOER, Maître de Recherches au CNRS et à Monsieur le Professeur MIALHE qui ont bien voulu accepter de faire partie de notre jury de thèse.

Nous remercions Monsieur le Professeur PORTE pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée dans la réalisation de l'étude ultrastructurale en microscopie électronique.

Nous tenons enfin à remercier tous nos amis des Laboratoires de Physiologie, de Chimie Biologique et du Département des Applications Biologiques du Centre Nucléaire qui ont contribué à la réalisation de ce travail dans une ambiance très sympathique.

CHOIX ET CONDITIONNEMENT DES ANIMAUX

Les expériences ont été réalisées avec des rats mâles de souche Wistar, élevage SODELABO. Les rats normaux pesaient en moyenne 250 g.

Une partie de ces rats ont été hypophysectomisés par voie latéro-pharyngée, six semaines avant leur utilisation pour les expériences. En vue de l'étude relative à l'action de l'hormone de croissance, certains animaux hypophysectomisés ont été traités à l'hormone somatotrope de boeuf, (don du NATIONAL INSTITUT OF HEALTH, Endocrinology Study Section, BETHESDA) préparée suivant la méthode de WILHELM I et coll. (1948), qui permet d'obtenir cette hormone à un degré élevé de pureté. Le traitement hormonal des rats hypophysectomisés consiste en deux injections sous-cutanées de 1 mg d'hormone de croissance, réalisées 20 heures et 12 heures avant le sacrifice.

Tous les animaux normaux ou traités ont été mis à jeun 15 heures avant le sacrifice. Pour les expériences concernant l'étude du RNA à marquage rapide, on effectue une injection intra-péritonéale sous un volume de 1 ml d'acide phosphorique ^{32}P (100 μCi pour 100 g de poids corporel) ou d'acide orotique ^{14}C (5 μCi pour 100 g de poids corporel), 20 minutes avant le sacrifice des animaux.

Les rats ont été généralement décapités. Dans quelques cas particuliers qui seront précisés, les foies ont été prélevés après laparotomie chez les rats préalablement anesthésiés à l'éther ou au phénobarbital.

* ^{32}P acide phosphorique, activité spécifique 80 mCi/m M,
CEA - FRANCE.

** ^{14}C -6 acide orotique, activité spécifique 37 mCi/m M,
CEA - FRANCE.

P R E M I E R E P A R T I E

RECHERCHES SUR LES RNA MESSAGERS CYTOPLASMIQUES ET NUCLEAIRES DU FOIE DE RATS NORMAUX OU HYPOPHYSECTOMISES

INTRODUCTION

ETAT ACTUEL DU PROBLEME DES CRITERES DU RNA MESSEAGER

Selon l'hypothèse de JACOB et MONOD (1961), le RNA messenger porteur du code génétique constitue le modèle (ou "template") pour l'arrangement spécifique des aminoacides en chaînes polypeptidiques. Copie du DNA avec une séquence des bases complémentaire de celle de certains de ses segments, ce polyribonucléotide transmet l'information génétique, transcrite du DNA, jusqu'aux sites de la synthèse protéique, c'est-à-dire les ribosomes.

L'institution de ce concept nouveau trouvait sa justification dans les progrès réalisés dans le domaine des mécanismes de la synthèse protéique et des différents rôles joués par les RNA dans ce processus. La notion de mRNA a conduit à la définition de critères différents selon les étapes successives des recherches effectuées dans ce domaine. A l'origine, la définition résultait des études sur les systèmes bactériens, puis le concept fut généralisé et appliqué aux systèmes animaux et végétaux.

Il se posait, dès lors, le problème de la détection, de l'isolement et de l'analyse de ces messagers. L'expérience idéale consisterait à isoler un mRNA bien individualisé, provenant de la transcription d'un DNA, et à faire la démonstration que cet RNA induit directement la synthèse d'une protéine spécifique. Mais cette expérience implique des difficultés techniques extraordinaires. C'est pourquoi, plusieurs critères moins directs ont été retenus pour caractériser le RNA messenger. Nous les énumérons ci-après en discutant brièvement quelle valeur on peut actuellement leur attribuer.

1) La composition en bases

Le concept de la complémentarité des bases résulte de la définition même du mRNA. Il est étayé par les expériences de JACOB et MONOD (1961) et de GROS et coll. (1961_a) relatives à l'infection des bactéries *E. coli* par le phage T₂. Dans ce cas, le RNA synthétisé après infection présentait une analogie dans la composition en bases avec le DNA du phage. Par la suite, plusieurs travaux ont relaté l'existence chez les animaux de RNA nucléaires dont la composition en bases était voisine de celle du DNA, mais ces expériences étaient généralement basées sur l'estimation de la radioactivité des nucléotides après des marquages courts par le phosphate ³²P et il a été montré que l'interprétation de tels résultats était parfois erronée (WATTS, 1964 - WADE et coll., 1964). De plus, ces expériences impliquent que le RNA analysé est un mRNA pur, condition elle-même difficile à réaliser. Enfin, le fait que le mRNA peut correspondre à la copie d'un segment seulement du DNA et le fait que la transcription s'effectue sur un seul brin de la double hélice entraîne une nouvelle difficulté pour la justification de ce critère, en particulier chez les organismes supérieurs.

2) L'hybridation

Un DNA à simple brin peut dans des conditions définies former, par appariement des bases, un complexe avec un RNA dont la séquence des bases est complémentaire de celle du DNA. Cette hybridation semblait représenter un moyen élégant pour isoler les RNA messagers. Mais rapidement on a constaté qu'en fait tous les RNA cellulaires, le rRNA et le tRNA compris pouvaient former des hybrides avec le DNA homologue (SPIEGELMAN et coll., 1963). Néanmoins, ce test présente une certaine valeur du fait que le taux d'hybridation des mRNA est beaucoup plus élevé que celui des autres types de RNA.

3) Le poids moléculaire

Bien que l'on puisse postuler qu'un mRNA donné correspondant à une protéine déterminée possède un poids moléculaire défini, les mRNA totaux d'une cellule peuvent recouvrir une échelle de poids moléculaires assez large. En général, la détermination du poids moléculaire des RNA est basé sur l'analyse en gradient de saccharose et la me-

sure des constantes de sédimentation par ultracentrifugation. Mais ce critère pose de nombreux problèmes : possibilité de dégradation des mRNA au cours de l'extraction, interaction du mRNA avec le rRNA, formation d'agrégats selon les conditions expérimentales, changement de forme par modification des structures secondaires et tertiaires selon la force ionique et le pH des solutions. D'autre part, s'il est possible de séparer facilement le sRNA et les deux constituants du rRNA, il n'en est pas de même en ce qui concerne les précurseurs du RNA ribosomal. Enfin, des données récentes montrent l'existence de mRNA polycistronique, portant par conséquent le message pour plusieurs protéines. Pour toutes ces raisons, la valeur du critère du poids moléculaire apparaît très aléatoire.

4) Attachement du mRNA aux ribosomes : les polysomes

Conformément au modèle classique, le mRNA constitue la chaîne qui associe entre eux les ribosomes en une structure polyribosomale ou polysomale. Cette structure peut être facilement observée au microscope électronique. Il paraît ainsi théoriquement possible d'obtenir les RNA messagers en isolant préalablement les polysomes, puis en détachant les ribosomes sans provoquer la rupture des brins de mRNA. Récemment, CHANTRENNE et coll. (1967) ont utilisé ce critère pour isoler le mRNA présumé de l'hémoglobine à partir de réticulocytes de lapin. Il ne s'agit cependant ici que d'un critère pour l'isolement des mRNA et non d'un test de fonction ; nous verrons plus loin que jusqu'à présent la reconstitution *in vitro* des polysomes, à partir du mRNA et des ribosomes, n'a pu être démontrée avec certitude.

5) Le marquage rapide

Chez les bactéries, les cinétiques d'induction des enzymes, suggèrent que les RNA messagers sont instables et ont une demi-vie relativement courte. Le critère du marquage pendant un temps court, traduisant le renouvellement rapide de ces RNA a été souvent utilisé pour la caractérisation du mRNA. Mais chez les animaux, la synthèse d'hémoglobine dans les réticulocytes en absence de toute synthèse de RNA, laisse supposer que ces cellules anucléées contiennent des RNA messagers stables. Il semble, actuellement, que dans beaucoup de types cellulaires il existe à la fois des mRNA stables à demi-vie longue et des mRNA instables à demi-vie brève.

D'autre part, on sait maintenant qu'il existe, en dehors des mRNA, d'autres RNA à renouvellement rapide comme probablement les précurseurs du rRNA. Le marquage rapide ne permet donc pas de détecter les RNA messagers stables et peut aussi révéler des RNA à renouvellement rapide qui ne sont pas des messagers. Ce critère a souvent été associé aux effets de l'actinomycine D que l'on considèrerait comme un inhibiteur spécifique de la transcription des RNA messagers, mais cette propriété est actuellement remise en question, surtout dans les expériences in vivo chez les animaux.

6) Stimulation de l'incorporation des aminoacides dans les protéines

L'étude des systèmes acellulaires de synthèse protéique a apporté la preuve la plus évidente pour le concept de RNA messenger. Dans ces systèmes, le messenger peut être un RNA naturel ou un autre polyribonucléotide capable d'induire l'incorporation des aminoacides dans les protéines. Ces études ont en effet montré que des polyribonucléotides de synthèse pouvaient servir de modèle pour l'enchaînement spécifique des aminoacides dans une chaîne polypeptidique. Ce fait seul apporte une certaine garantie pour l'interprétation des expériences réalisées avec des mRNA naturels. Ce critère semble donc, actuellement, le plus direct pour caractériser un mRNA naturel, mais en général on se contente de vérifier l'incorporation des aminoacides dans les polypeptides en présence de mRNA, sans déterminer la nature de la protéine formée.

La valeur heuristique de l'hypothèse du RNA messenger est de toute évidence considérable sous l'angle de la régulation des mécanismes biologiques, notamment dans le domaine du contrôle hormonal chez les organismes supérieurs. Dans notre travail, relatif aux corrélations des hormones hypophysaires et de la synthèse protéique au niveau du foie, nous avons retenu deux critères pour la caractérisation du RNA messenger : le marquage rapide et l'activité d'incorporation des aminoacides dans les protéines dans un système acellulaire.

A - PREPARATION ET ANALYSE DES RNA A MARQUAGE RAPIDE CYTOPLASMIQUE ET NUCLEAIRE

CHAPITRE I

PREPARATION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES

1. Préparation de la fraction cytoplasmique et de la fraction nucléaire brute

Les foies sont prélevés après perfusion par la veine cave inférieure, successivement avec 40 ml d'une solution de NaCl à 9 p. 1000 et 20 ml d'une solution de saccharose 0,25 M, CaCl₂ 0,001 M, KH₂PO₄ 0,0008 M ajustée à pH 6,8 (solution A), les deux solutions étant maintenues à 0°C. Après le prélèvement, les foies sont immédiatement immergés dans la solution A. Toutes les opérations ultérieures sont effectuées entre 0 et 4°C.

Le foie est découpé en petits morceaux et broyé dans un homogénéiseur de Potter-Elvehjem à raison de 5 g de tissus dans 30 ml de solution A contenant du PVS à la concentration de 100 µg/ml. Un premier broyage est effectué avec un homogénéiseur ayant un jeu de piston de 0,5 mm. Ce broyat est passé une seconde fois dans un homogénéiseur à piston en téflon ayant un jeu de 0,12 mm. L'homogénat est ensuite filtré sur étamine.

Le premier broyage aboutit à une dispersion du tissu à l'état de cellules isolées ou d'amas de quelques cellules. Le deuxième broyage entraîne la destruction de la plupart des membranes cellulaires en respectant les noyaux. La filtration permet d'éliminer les débris de tissus conjonctifs.

Le filtrat est ensuite centrifugé pendant 8 minutes à 800 g dans une centrifugeuse Jouan K. 63 F, dans des tubes coniques. Le surnageant est prélevé à l'aide d'une seringue ; il représente la fraction cytoplasmique.

Le culot ainsi obtenu est remis en suspension dans 20 ml de solution A, à l'aide de l'homogénéiseur à piston en téflon. La suspension est coulée avec précaution sur une couche de 30 ml d'une solution de saccharose 0,4 M, CaCl_2 0,001 M, KH_2PO_4 0,0008 M à pH 6,8 (solution B), et centrifugée pendant 8 minutes à 1 000 g comme précédemment. Cette opération permet d'obtenir le culot nucléaire brut (schéma II).

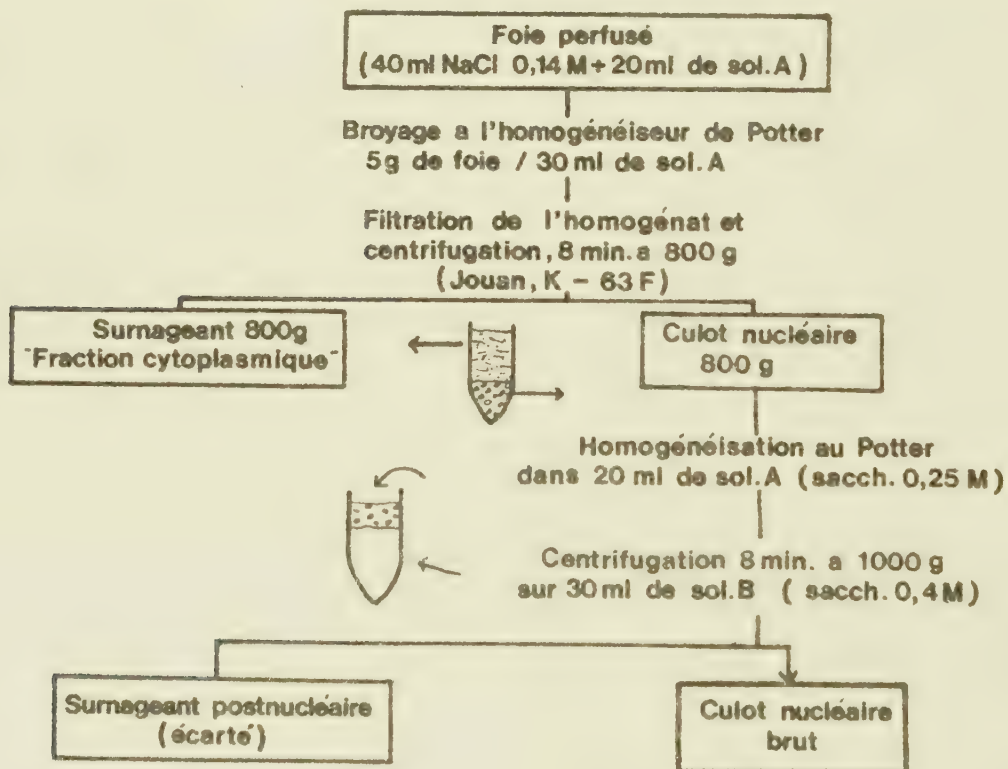


Schéma II . - Préparation d'un "culot nucléaire brut".

2. Préparation de noyaux purifiés

Plusieurs techniques sont actuellement à notre disposition pour obtenir, à partir de divers tissus, des noyaux raisonnablement purs débarrassés des organites et constituants cytoplasmiques.

Une des premières méthodes, utilisée avec succès, a été celle de BEHRENS (1932) consistant à lyophiliser le tissu préalablement congelé, puis à le réduire en poudre par broyage avant de le mettre en suspension dans un solvant organique. La séparation du matériel nucléaire peut alors être obtenue par une série de centrifugations différentielles. Cette méthode a été considérablement développée par SIEBERT (1964) ; elle possède l'avantage de réduire les pertes de substances hydrosolubles intranucléaires, mais les structures nucléaires sont profondément modifiées et il est très difficile d'éliminer certains éléments de contamination cytoplasmiques.

Les méthodes basées sur la purification en milieu aqueux, sont généralement beaucoup plus rapides et permettent une meilleure conservation des structures intranucléaires. Parmi celle-ci, la technique proposée par STONEBURG (1939) emploie des solutions d'acide citrique comme milieu de purification. Cette technique développée surtout par MIRSKY (1946) et DOUNCE (1948), facilite la séparation des éléments cytoplasmiques, mais entraîne une précipitation du nucléoplasme.

Par la suite ont été élaborées des techniques utilisant des solutions de saccharose. Dans ce milieu, les noyaux isolés et examinés au microscope électronique se rapprochent morphologiquement le plus de leur aspect normal dans la cellule vivante intacte. Cette méthode décrite par HOGEBOOM et SCHNEIDER (1948) a pris une extension rapide et a bénéficié d'améliorations successives, notamment par l'emploi de faibles concentrations de Ca^{++} et de Mg^{++} dans les solutions de saccharose, permettant d'éviter l'agglutination des noyaux (HOGEBOOM et coll., 1952). Dans ce domaine, une des méthodes actuellement la plus largement répandue est celle de CHAUVEAU et coll., (1956) et MOULE et coll., (1959), basée sur l'emploi de solutions de saccharose fortement hypertoniques, dans lesquelles les noyaux peuvent être sédimentés rapidement grâce à l'ultracentrifugation.

Plus récemment, une autre technique a été introduite par ZALTA et coll. (1962_{a,b}), utilisant simultanément un milieu de saccharose faiblement concentré et des agents tensio-actifs, tel le Cémulsol. Cette méthode permet d'obtenir des noyaux hépatiques d'une grande pureté. Des modifications y ont été apportées par l'emploi d'autres agents tensio-actifs tel le Triton X-100 (DUKES et coll., 1966) par exemple.

Un autre moyen pour l'obtention à l'état purifié du matériel intranucléaire est la méthode proposée par GEORGIEV et coll. (1962, 1963). C'est une méthode plus indirecte, basée sur la solubilité différentielle du matériel nucléaire dans les milieux d'extraction phénoliques.

Dans notre travail, nous avons essentiellement utilisé deux de ces techniques : celle de CHAUVEAU (1956) et celle de ZALTA (1962_b), en y apportant certaines modifications pour les adapter à notre problème.

a) Méthode de CHAUVEAU modifiée

(a) Description technique.

Le culot nucléaire 800 g provenant de 5 g de foie (voir préparation au paragraphe 1) est rapidement remis en suspension dans 15 ml de solution A à l'aide de l'homogénéiseur de Potter. La suspension nucléaire est immédiatement déposée à la surface d'une solution de saccharose 2,2 M, CaCl_2 0,001 M, KH_2PO_4 0,0008 M à pH 6,8, à raison de 15 ml de suspension pour 30 ml de solution de saccharose hypertonique dans des tubes de 50 ml en nitrate de cellulose. Puis on procède à une centrifugation de 2 h à 48 000 g dans le rotor Spinco SW-25.2 à 4°C. Après cette centrifugation, chaque culot nucléaire est repris par 8 ml d'une solution de saccharose 1 M, CaCl_2 0,001 M, KH_2PO_4 0,0008 M à pH 6,8, homogénéisé rapidement à l'aide de l'appareil de Potter et centrifugé à 0°C dans un tube conique pendant 5 min. à 2 000 g (centrifugeuse Jouan K-63 F). On obtient ainsi le culot nucléaire purifié final ("noyaux de type CHAUVEAU"), à partir duquel sont effectués les divers contrôles et les extractions de RNA (schéma III).

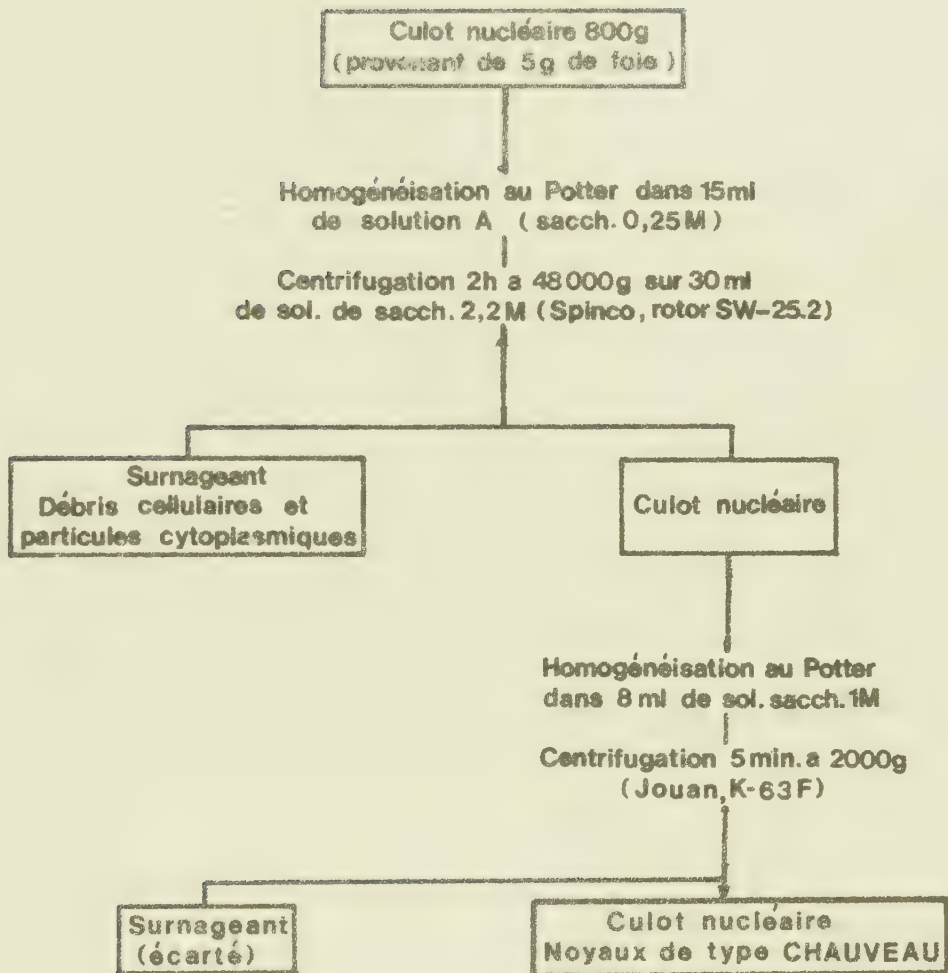


Schéma III. - Préparation de noyaux purifiés de type CHAUVEAU.

(β) Contrôle de pureté au microscope électronique.

Pour l'examen au microscope électronique, on effectue des prélèvements de 1 à 2 mm³ dans la partie centrale du culot nucléaire que l'on fixe pendant 2 h à 0°C dans la solution OsO₄ 0,039 M, tampon acétate-véronal à pH 7,6. Les pièces sont déshydratées à l'éthanol et incluses soit dans le métacrylate, soit dans l'araldite. Des coupes semi-fines sont ensuite colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb et examinées au microscope électronique Siemens Elmiskop I.

On constate (planche I) que dans ces culots il subsiste fréquemment des particules de matériel cytoplasmique : fragments ergastoplasmiques, fibrilles de collagène, mitochondries et microsomes. La membrane nucléaire est constituée par ses deux feuilletts, mais il apparaît qu'un certain nombre de particules ribosomales (grains de Pallade) restent accolées au feuillet externe. On distingue bien la persistance d'une couronne périnucléaire composée d'éléments du réticulum endoplasmique et de quelques microsomes accolés à la membrane nucléaire. Dans cette dernière, un certain nombre de pores sont visibles. Les noyaux rompus ou endommagés sont relativement rares et la structure des nucléoles semble bien conservée. La chromatine présente souvent des zones anormalement denses.

b) Méthode de ZALTA modifiée

(α) Description technique.

Les diverses opérations sont effectuées en chambre froide à 2°C. Chaque culot nucléaire 800 g provenant de 5 g de foie (voir préparation au paragraphe 1) est remis en suspension dans 10 ml de milieu Earle potassium - saccharose 0,25 M à pH 6,8 (mélange dans les proportions 10 : 1, V/V) à l'aide de l'appareil Ultra-Turrax^{*} tournant sous une tension de 80 volts, pendant 1 min. Puis la suspension est rapidement diluée et homogénéisée par addition de 30 ml de milieu Earle potassium-saccharose 0,25 M (mélange 5:4, V/V). L'homogénat est centrifugé pendant 3 min. à 600 g dans la centrifugeuse Jouan, K-63 F. Le surnageant est éliminé par aspiration à la trompe à vide avec une pipette Pasteur.

* Ultra-turrax TP 18/2 ; Janke et Kunkel, Staufen, Br.,
Allemagne.

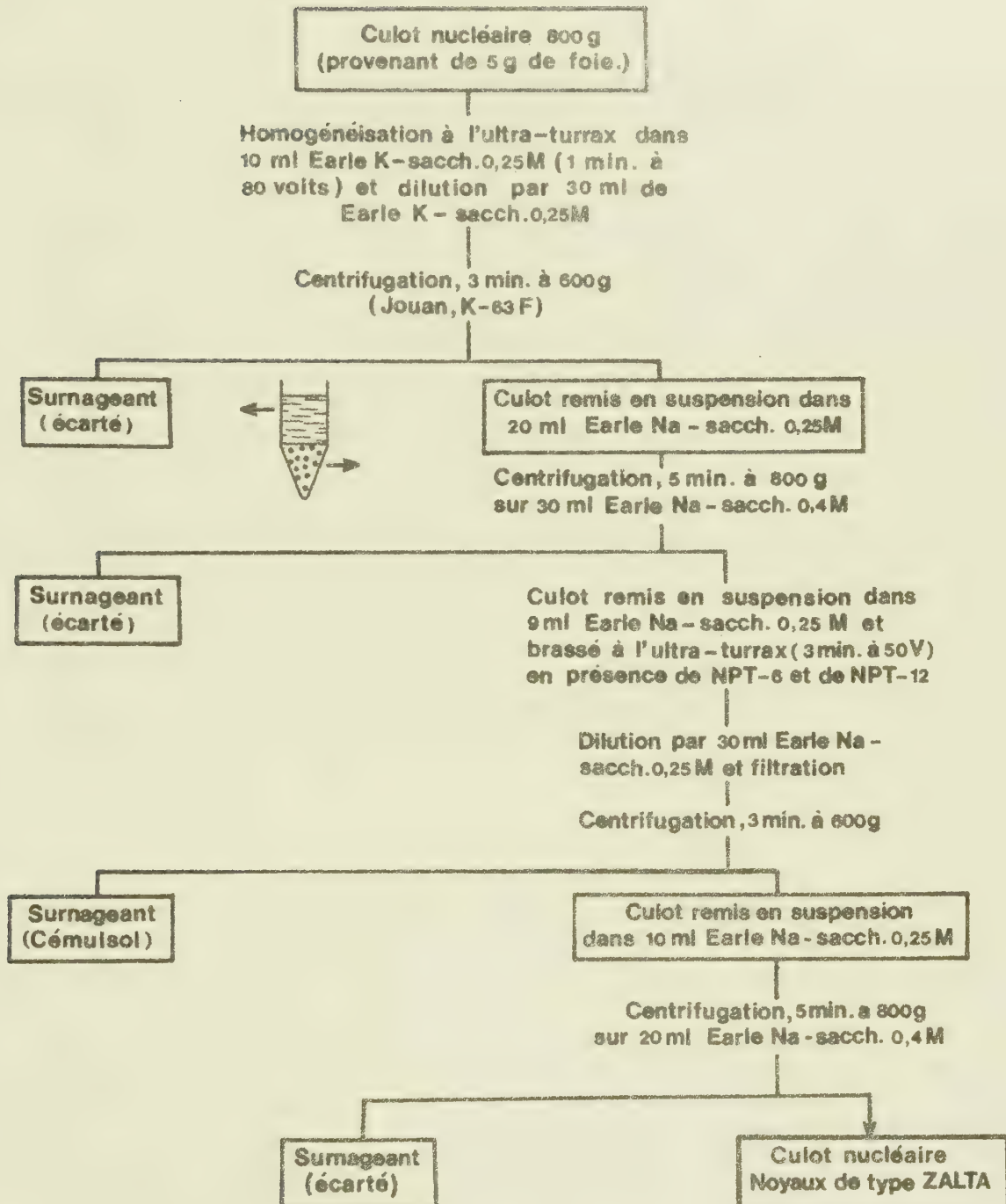


Schéma IV. - Préparation de noyaux purifiés de type ZALTA.

Le culot est remis en suspension dans 20 ml de milieu Earle sodium-saccharose 0,25 M (mélange 1 : 4, V/V), dispersé pendant 10 secondes à l'Ultra-Turrax tournant sous une tension de 50 volts et centrifugé pendant 5 min. à 800 g sur 30 ml de milieu Earle sodium-saccharose 0,4 M (mélange 1 : 4, V/V). Le culot obtenu est repris par 9 ml de milieu Earle sodium-saccharose 0,25 M (mélange 1 : 4, V/V) et dispersé à l'Ultra-Turrax tournant sous 50 volts pendant 10 secondes. Puis on injecte dans l'homogénat 1,5 ml d'une émulsion de Cémulsol NPT-6 à 1,5 p. 100 et on continue à brasser à l'Ultra-Turrax jusqu'au temps de 2 min. A ce moment, on injecte 1,5 ml de Cémulsol NPT-12 à 1,5 p. 100 et on prolonge le brassage jusqu'à 3 min. L'homogénat ainsi traité est rapidement dilué par addition de 30 ml de milieu Earle sodium-saccharose 0,25 M (mélange 1 : 4, V/V). Le tout est filtré à travers une épaisseur d'étamine et centrifugé pendant 3 min. à 600 g dans des tubes coniques. Le culot nucléaire est finalement repris par 10 ml de milieu Earle sodium-saccharose 0,25 M, dispersé à l'Ultra-Turrax pendant 10 sec. sous 50 volts et centrifugé une dernière fois pendant 5 min. à 800 g sur 20 ml du milieu à densité plus élevée, Earle sodium-saccharose 0,4 M. Le surnageant est écarté par aspiration. Le culot est constitué de noyaux purs que nous appellerons "noyaux de type ZALTA" (schéma IV).

(8) Contrôle au microscope électronique.

Les prélèvements et les opérations de fixation, d'inclusion et de coloration pour la microscopie électronique sont effectués comme indiqué ci-dessus pour les noyaux de type CHAUVEAU.

L'examen des coupes semi-fines (planche II) montre que les culots obtenus sont constitués de noyaux pratiquement dépourvus de contaminations cytoplasmiques. L'aspect et la densité du nucléoplasme sont très voisins de ceux des noyaux observés sur des coupes de tissu hépatique. On observe une attaque du feuillet externe de la double membrane nucléaire, le feuillet interne reste apparemment intact. La proportion de noyaux rompus est faible. Les nucléoles semblent avoir conservé leur structure caractéristique. On n'observe plus de pores dans la membrane nucléaire ; cette dernière prend un aspect grenu qui est peut-être dû à un remaniement moléculaire de l'édifice lipo-protéique au cours de la purification.

c) Contrôle de la capacité fonctionnelle et détermination du contenu en acides nucléiques des noyaux purifiés.

Avant d'aborder l'étude des RNA des noyaux isolés selon les deux méthodes précédentes, nous avons vérifié dans quelle mesure ceux-ci conservaient une activité biologique. A cet effet, nous avons étudié leur capacité d'incorporer les aminoacides dans les protéines. Nous avons pu montrer par incubation in vitro (BECK et coll., 1968), que les deux types

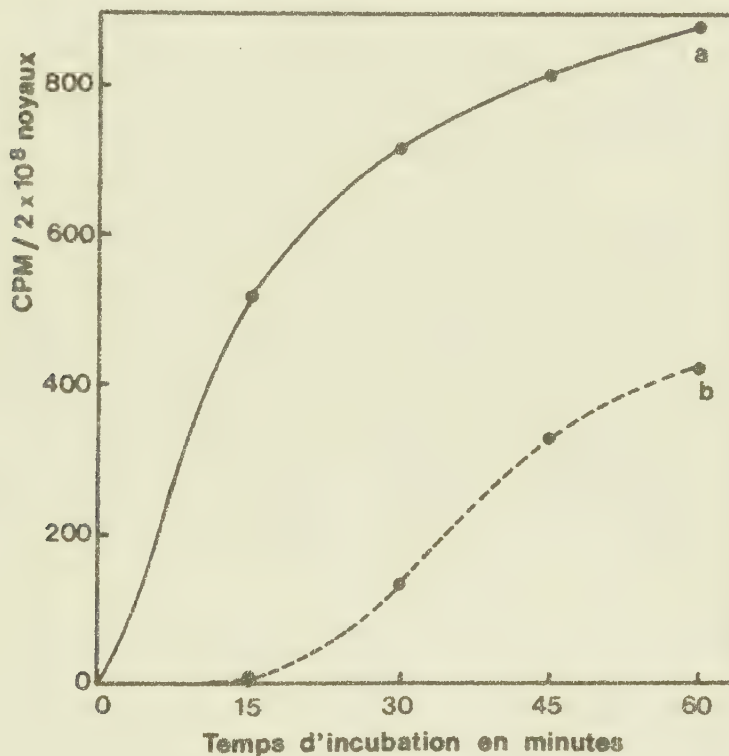


Fig. 1 - Incorporation de ^{14}C -aminoacides (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ d'un hydrolysate de chlorelles, act. spéc. 500 $\mu\text{Ci}/3,45$ mg) dans les protéines nucléaires :

- a. - de noyaux préparés par la méthode de ZALTA.
 - b. - de noyaux préparés par la méthode de CHAUVEAU.
- (Des fractions de 2 ml, contenant 2×10^8 noyaux sont incubés à 37°C dans le milieu Earle sodium saturé en $\text{O}_2\text{-CO}_2$ (95-5%).

de noyaux conservaient une certaine capacité de synthèse protéique. L'incorporation des acides aminés a lieu très rapidement dans les noyaux de type ZALTA et augmente en fonction du temps d'incubation. Par contre, les noyaux de type CHAUVEAU n'incorporent pas de ^{14}C -aminoacides durant les 15 premières minutes d'incubation ; après cette période de latence, l'incorporation s'amorce lentement pour atteindre après 60 minutes environ 50 p. 100 de la valeur obtenue avec les noyaux de type ZALTA (figure 1). Ceci pourrait s'expliquer par une plus grande perméabilité des noyaux de type ZALTA aux ^{14}C -aminoacides.

Ces résultats montrent que les noyaux de type ZALTA, débarrassés des contaminations cytoplasmiques, présentent une capacité d'incorporation des aminoacides dans leurs protéines supérieure à celle des noyaux de type CHAUVEAU.

La détermination par la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945) du rapport RNA/DNA conduit à des valeurs de 0,21 à 0,25 pour les noyaux de type CHAUVEAU et de 0,095 à 0,15 pour les noyaux de type ZALTA. Dans ce dernier cas, nous avons pu évaluer le contenu en ARN à 1,2 μg et en ADN à 12,6 μg par noyau. Par ailleurs, l'extraction phénolique de l'ARN, par les techniques de SCHERRER et DARNELL (1962) ou de SPORN et DINGMAN (1963), à partir d'une même quantité de noyaux, permet d'obtenir avec les noyaux de type CHAUVEAU un rendement environ 2 à 3 fois supérieur à celui des noyaux de type ZALTA (voir chapitre II, paragraphe 1 b et 1 c).

CHAPITRE II

METHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES RNA DE FOIE DE RAT

1. Méthodes d'extraction

Toutes les méthodes que nous avons utilisées reposent sur le même principe, la déprotéinisation par l'action combinée du dodécylsulfate de sodium (SDS) et du phénol. Trois types de méthodes basées sur ce principe ont été décrites, différant entre elles par la température à laquelle est effectuée cette déprotéinisation. Dans la première méthode, dérivée de la technique mise au point par MONIER et coll. (1962) pour la préparation du RNA de *E. Coli*, l'extraction est effectuée à basse température (2°C). Dans une deuxième méthode, dérivée de celle décrite par SPORN et DINGMAN (1963) pour l'extraction du RNA de foie de rat, cette dernière est effectuée à la température ambiante (22°C). Dans une troisième méthode dérivée de celle de SCHERRER et DARNELL (1962) mise au point pour l'extraction du RNA à partir de cellules Hela, l'extraction est effectuée à chaud (50° à 65°C).

a) Méthode dérivée de celle de MONIER et coll.

Toutes les opérations sont effectuées en chambre froide à 2°C. Le culot nucléaire brut est repris et dispersé pendant 1 min. à l'Ultra-Turrax sous une tension de 80 volts dans 25 ml de tampon Tris-HCl 0,01 M, MgCl₂ 0,001 M à pH 7 contenant 100 µg de PVS parml. Dans le cas des noyaux purifiés, chaque culot correspondant à 5 g de foie est repris par 10 ml seulement du même tampon. Après cette opération qui entraîne la lyse des noyaux, on ajoute du SDS à la concentration finale de 2,5 p. 100 et 1 volume de phénol saturé par le tampon précédent et contenant 0,1 p. 100 d'hydroxyquinoléine. Le mélange obtenu est agité durant 30 min., puis centrifugé pendant 15 min. à 3000 g. La phase phénolique est écartée par siphonage et la phase aqueuse et l'interphase sont soumises à une nouvelle déprotéinisation

de 15 min. par 0,5 volume de phénol saturé. Finalement, le RNA est précipité par 2 volumes d'éthanol froid à -20°C contenant 2 p. 100 d'acétate de potassium. On laisse le précipité se former pendant une nuit à cette température. Le précipité est ensuite récupéré par centrifugation, dissous dans de l'eau bidistillée et reprécipité par 2 volumes d'éthanol-acétate de potassium 2 p. 100, à -20°C .

b) Méthode dérivée de celle de SPORN et DINGMAN

Le culot nucléaire provenant de 5 g de foie est repris par 25 ml de tampon phosphate de potassium 0,001 M à pH 7, dans le cas d'un culot nucléaire brut, ou par 10 ml de ce tampon dans le cas d'un culot nucléaire purifié. Les noyaux sont dispersés dans l'homogénéiseur de Potter par 3 passages du piston en téflon. A la suspension ainsi obtenue, on ajoute du SDS à une concentration finale de 0,1 p. 100 et on agite fortement pendant 5 minutes à la température ambiante. Puis on ajoute 1,5 volume de phénol saturé d'eau et on poursuit l'agitation pendant 15 minutes à la même température. Le mélange est centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à 3.000 g. La phase phénolique est éliminée par siphonage. L'ensemble de la phase aqueuse et de l'interphase est rendu 0,2 M en acétate de potassium et traité une nouvelle fois par 1 volume de phénol saturé d'eau pendant 15 minutes. Une dernière extraction est effectuée avec 0,5 volume de phénol saturé d'eau. La phase aqueuse finale est additionnée de 2,5 volumes d'éthanol à -20°C . Le précipité de RNA est ensuite traité comme indiqué ci-dessus. (paragraphe 1 a).

c) Méthode dérivée de celle de SCHERRER et DARNELL

Nous avons employé la technique de SCHERRER et DARNELL mise au point pour l'extraction du RNA à partir de cellules Hela, avec les modifications apportées par BUSCH et coll. (1965_{a,b}) pour l'application au foie de rat. Dans cette méthode la déprotéinisation est effectuée à 63°C .

Le culot nucléaire obtenu à partir de 5 g de foie est repris par 25 ml (culot nucléaire brut) ou 10 ml (noyaux purifiés) de tampon acétate de sodium 0,05 M, NaCl 0,14 M à pH 5 contenant 0,3 p. 100 de SDS et dispersé dans l'homogénéiseur à piston en téflon. On agite 5 minutes à la température ambiante. Une première extraction est effectuée

à 63°C pendant 5 minutes avec 1 volume de phénol saturé avec le même tampon et auquel on ajoute extemporanément 0,1 p. 100 de 8-hydroxyquinoléine. L'agitation est poursuivie pendant 10 minutes à la température ambiante. Le mélange obtenu est centrifugé à froid pendant 15 minutes à 3.000 g. La phase phénolique est éliminée par siphonage et l'ensemble de la phase aqueuse et de l'interphase est réextrait avec 1 volume de phénol 8-hydroxyquinoléine-tampon acétate, pendant 15 minutes à la température ambiante. Une troisième extraction est réalisée dans les mêmes conditions, avec 0,5 volume de phénol saturé. La phase aqueuse finale est précipitée par 2 volumes d'éthanol à - 20°C. Les opérations suivantes sont identiques à celles décrites précédemment.

2. Analyse des RNA par centrifugation en gradient de concentration de saccharose

Après centrifugation, le précipité est dissous dans l'eau bidistillée et la concentration en RNA déterminée au spectrophotomètre par absorption à 260 m μ est ramenée à 2,5 mg/ml. Les centrifugations en gradient de saccharose sont effectuées suivant la technique de GROS et coll.(1961_b). On dépose 0,2 ml de la solution de RNA sur un gradient linéaire de concentration de saccharose de 5 à 40 p. 100, préparé dans un tampon acétate de sodium 0,02 M, NaCl 0,1 M, EDTA 0,001 M, PVS 10 μ g/ml à pH 5. On centrifuge pendant 4 heures à 43.000 t/min. dans le rotor Spinco SW-50 à 5°C. A la fin de la centrifugation, le contenu des tubes est récupéré par fractions de trois gouttes, en perçant le fond des tubes. Une goutte de chaque fraction sert à la détermination du profil d'absorption à 260 m μ , les deux autres gouttes sont traitées par 2 ml de TCA 5 p. 100 à 0°C en présence de 50 μ l d'une solution d'albumine à 1 p. 100, pour la précipitation du RNA. Le précipité est filtré et lavé par le TCA 5 p. 100 froid, sur des membranes filtrantes Sartorius-MF 50, pour les déterminations de la radioactivité. Cette dernière est mesurée à l'aide d'un compteur Beckman-Lowbeta II.

CHAPITRE III

APPLICATION DES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION DES RNA A LA FRACTION CYTOPLASMIQUE : ETUDE DU RNA CYTOPLASMIQUE A MARQUAGE RAPIDE DU FOIE DE RATS NORMAUX OU HYPOPHYSECTOMISES

Les méthodes d'extraction des RNA décrites au Chapitre II ont été appliquées à la fraction cytoplasmique telle qu'elle a été définie au Chapitre I, paragraphe 1.

Le contrôle microscopique de cette fraction montre qu'elle ne renferme plus de cellules entières ni de noyaux. On y trouve par contre les organites cytoplasmiques classiques : mitochondries, microsomes, vésicules membranaires lisses, polysomes et ribosomes libres.

Signalons d'abord que, quelle que soit la méthode d'extraction des RNA employée, le rendement à partir d'une même quantité de tissus est sensiblement le même, dans le cas des foies de rats normaux. Pour les foies d'animaux hypophysectomisés, ce rendement, pour la même quantité de tissus, est diminué de 30 à 40 p. 100.

Les profils de centrifugation en gradient de concentration de saccharose, sont consignés dans les figures 2 a et 2 b.

L'examen du profil d'absorption dans l'ultra-violet (U.V.) montre dans tous les cas la présence des constituants ribonucléiques classiques du cytoplasme : les deux pics du RNA ribosomal dont l'étude par ultracentrifugation analytique (Beckman, modèle E avec cellule Kel F) a confirmé les valeurs des constantes de sédimentation qui sont respectivement de 28 S et 18 S, ainsi que le pic 4-5 S correspondant aux RNA de transfert et au RNA ribosomal 5 S (HIATT, 1962 - SPORN et DINGMAN, 1963 - HADJIOLOV, 1966).

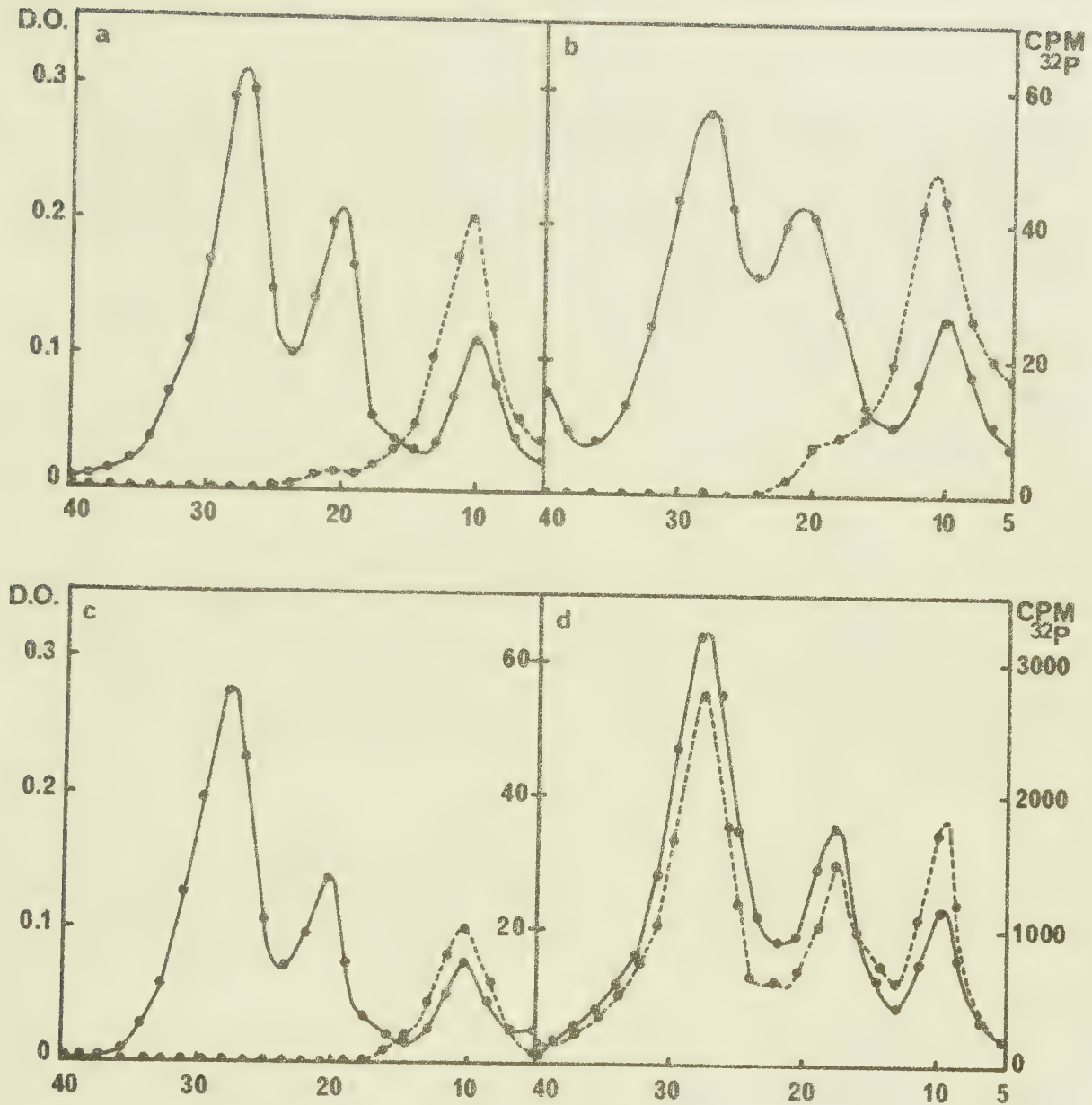


Fig. 2 - Profils en gradient de saccharose de RNA cytoplasmiques, après un marquage court de 20 min. au phosphate ³²P.

- a. - de foies de rats normaux (extrait par la technique de MONIER)
- b. - de foies de rats normaux (extrait par la technique de SCHERRER)
- c. - de foies de rats hypophysectomisés (extrait par la technique de SPORN et DINGMAN)
- d. - de foies de rats normaux (Extrait par la technique de SPORN et DINGMAN) après un marquage long de 15 h, donné à titre de comparaison.

D.O. à 260 mμ —●— ; Radioactivité - - - - -

Les valeurs portées en abscisse correspondent à la concentration en saccharose (g pour 100 ml) des différentes fractions.

Pour les RNA préparés à basse température par la méthode de MONIER et coll. (1962), ou par la méthode de SPORN et DINGMAN (1963), les profils U.V. sont pratiquement identiques. Les constituants 28 S et 18 S du rRNA sont présents dans le rapport 3 : 1. Le constituant 4-5 S représente environ 10 p. 100 du RNA total.

Pour les RNA préparés à chaud par la méthode de SCHERRER et DARNELL (1962), le profil U.V. présente quelques différences. On observe dans le cas du rRNA une certaine tendance à la polydispersité. Les pics 28 S et 18 S sont généralement plus étalés. Par ailleurs, la proportion du RNA 18 S est plus importante, ce qui se traduit par un rapport RNA 28 S : RNA 18 S voisin de 2 : 1.

En ce qui concerne les profils de radioactivité après un marquage court de 20 minutes par le phosphate ^{32}P , l'image obtenue est identique pour les RNA préparés par les trois méthodes : la radioactivité est uniquement localisée au niveau du pic 4-5 S. Elle ne correspond pas à un RNA de type messenger, mais au renouvellement rapide du triplet terminal pC pC pA des tRNA. En effet, cette radioactivité au niveau de ce pic n'apparaît pas lorsque le marqueur employé est l'acide orotique ^{14}C .

Aucune différence qualitative n'apparaît dans les profils U.V. ou de radioactivité des RNA extraits par ces mêmes techniques à partir de foies provenant d'animaux hypophysectomisés. La figure 2 c montre les profils obtenus avec un tel RNA extrait par la méthode de SPORN et DINGMAN.

Discussion :

Il apparaît à la suite de cette étude que les seules différences que l'on observe au niveau du RNA cytoplasmique de foie de rats normaux ou hypophysectomisés, sont des différences quantitatives. Le rendement en RNA chez les animaux hypophysectomisés, pour la même quantité de tissus, est diminuée de 30 à 40 p. 100. Aucune différence qualitative n'a pu être mise en évidence par l'analyse des RNA en gradient de saccharose.

En ce qui concerne les différentes méthodes d'extraction des RNA cytoplasmiques, elles conduisent toutes à des RNA présentant des caractéristiques sensiblement identiques.

Cependant, le RNA extrait à chaud par la méthode de SCHERRER et DARNELL présente une légère tendance à la polydispersité avec apparition d'une plus grande proportion du constituant 18 S. En raison de ce résultat et compte-tenu du fait que son application est plus laborieuse que celle des méthodes réalisées à froid ou à température ordinaire, il semble préférable d'utiliser ces dernières méthodes pour l'extraction du RNA cytoplasmique du foie de rat, à condition toutefois d'avoir soigneusement éliminé la fraction nucléaire.

CHAPITRE IV

APPLICATION DES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION DES RNA A LA FRACTION NUCLEAIRE : ETUDE DES RNA NUCLEAIRES A MARQUAGE RAPIDE DES FOIES DE RATS NORMAUX ET HYPOPHYSECTOMISES

Nous étudierons dans ce chapitre l'application des méthodes d'extraction des RNA telles qu'elles ont été décrites au chapitre II, aux trois catégories de fractions nucléaires définies au Chapitre I : culot nucléaire brut, noyaux purifiés selon la méthode de CHAUVEAU et coll. (1956), et noyaux purifiés selon la méthode de ZALTA et coll. (1962).

Ces RNA ont été analysés par centrifugation en gradient de concentration de saccharose dans les conditions définies au chapitre II, paragraphe 2 : gradients de concentration de saccharose de 5 à 40 p. 100, dans le tampon acétate de sodium à pH 5.

Auparavant, il est nécessaire de discuter de quelques problèmes d'ordre méthodologique particulièrement importants dans l'extraction des RNA nucléaires.

1. Problèmes méthodologiques

Il importe de tenir compte d'un certain nombre de facteurs pour réaliser les conditions optimales d'extraction des RNA nucléaires.

a) Problème de l'élimination du DNA

L'extraction des RNA des noyaux est compliquée par la présence de grandes quantités de DNA, qui dans les méthodes d'extraction à froid couramment utilisées pour la préparation des RNA en présence de concentration en SDS assez élevée (de 1 à 3 p. 100), passe dans la phase aqueuse. La méthode

de MONIER et coll. (1962) qui opère entre 0 et 4°C, est un exemple de ce type et conduit à l'extraction de quantités importantes de DNA. C'est pourquoi le protocole de cette méthode, décrit pour l'extraction des RNA bactériens, prévoit l'emploi de DNase. Mais l'utilisation de la DNase dans le cas de matériel nucléaire animal n'est pratiquement pas possible en raison, d'une part du très grand excès de DNA par rapport au RNA, nécessitant l'emploi de fortes concentrations de l'enzyme, et, d'autre part de la difficulté d'avoir des préparations de DNase rigoureusement dépourvues d'enzymes attaquant les RNA.

La méthode de SPORN et DINGMAN (1963), opère à une température plus élevée que la méthode précédente (20 à 22°C) mais à des concentrations en SDS plus faibles (0,1 p. 100). Ces conditions conduisent à l'extraction quasi-sélective du RNA, le DNA étant retenu sous forme de gel de nucléohistones dans la phase intermédiaire.

La méthode de SCHERRER et DARNELL (1962), opère à température élevée (63°C) et à une concentration en SDS un peu supérieure à celle utilisée dans la méthode précédente (0,3 p. 100). Dans ces conditions le DNA reste sous forme insoluble, ce qui permet d'obtenir des préparations de RNA pur.

Les deux techniques qui permettent donc d'obtenir assez facilement du RNA non contaminé par le DNA sont les techniques d'une part de SPORN et DINGMAN et d'autre part de SCHERRER et DARNELL.

b) Comparaison de la méthode de SPORN et DINGMAN
et de la méthode de SCHERRER et DARNELL

(α) Importance de la température d'extraction.

Les deux méthodes de SPORN et DINGMAN et de SCHERRER et DARNELL diffèrent entre elles par la nature du tampon d'extraction, par le pH de ce dernier et par la température à laquelle s'effectue l'extraction : 22°C dans la première de ces techniques, 63°C dans la deuxième.

Il importe de souligner que dans le cas de la méthode de SPORN et DINGMAN, une seule extraction ne suffit pas pour obtenir la totalité du RNA nucléaire. C'est pourquoi nous préconisons deux extractions supplémentaires sur

l'ensemble de la phase aqueuse et de l'interphase. En effet, une seule extraction ne permet généralement d'obtenir que 50 à 60 p. 100 du RNA nucléaire total. Les deux extractions supplémentaires permettent de monter à 90 p. 100 du RNA total. Par contre, en ce qui concerne le RNA à marquage rapide, les trois extractions que nous avons réalisées ne permettent d'obtenir qu'environ 30 p. 100 de la radioactivité totale incorporée dans les RNA. Pour extraire la totalité du RNA marqué, il est nécessaire d'effectuer une extraction à chaud.

T A B L E A U I

Comparaison des méthodes de
SPORN et DINGMAN et de SCHERRER et DARNELL,
pour l'extraction des RNA nucléaires

	Nombre d'extractions	RNA obtenu (mg)	Rapport D.O. 280/260	Radioactivité ¹⁴ C totale (CPM)	Radioactivité spécif. par mg de RNA (CPM)
Méthode de SPORN et DINGMAN	1ère	2,250	0,523	11.655	5.180
	2ème	1,800	0,584	2.934	1.630
	3ème	0,500	0,605	210	420
	4ème (à 63°)	0,670	0,580	11.920	17.790
Méthode de SCHERRER	1ère	4,540	0,504	46.490	10.240
	2ème	0,690	0,550	2.060	2.990
	3ème	0,340	0,635	193	570

Il devient, dans ces conditions, compréhensible que la technique à chaud (63°C) de SCHERRER et DARNELL soit mieux adaptée à l'extraction des RNA nucléaires. Nous avons en effet vérifié (tableau I) qu'elle permet en une seule extraction d'obtenir 75 p. 100 du RNA nucléaire et 95 p. 100 de la radioactivité incorporée dans ce RNA. Le traitement à chaud semble donc favoriser l'extraction des RNA à marquage rapide. Cependant, nous verrons plus loin que le traitement à chaud selon la méthode de SCHERRER et DARNELL peut apporter quelques modifications dans les profils de sédimentation des RNA nucléaires par rapport à ceux présentés par les RNA préparés selon la méthode de SPORN et DINGMAN.

(B) Importance du volume de tampon d'extraction.

Nous avons constaté, quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, que le taux de RNA obtenu est maximal lorsque le rapport du volume de tampon d'extraction au volume du culot nucléaire est de 2 à 3. Pour des rapports supérieurs à 5, on note une perte importante de RNA et ce dernier est de plus en plus contaminé par des impuretés (glycogène, ferritine). Le volume de tampon n'influe par contre pas sur les propriétés de sédimentation en gradient de saccharose des RNA à marquage rapide.

2. Etude du RNA nucléaire de foie de rats normaux

Nous étudierons le comportement en centrifugation en gradient de saccharose des RNA extraits par les trois méthodes précédemment décrites. Nous y incluons la méthode de MONIER et coll., quoique cette technique entraîne, comme nous venons de le voir, l'extraction de quantités importantes de DNA. Mais nous verrons qu'avec cette méthode, le profil de sédimentation des RNA à marquage rapide présente des caractéristiques particulières.

a) Culots nucléaires bruts

(α) Méthode d'extraction de MONIER et coll.

Les profils d'absorption à 260 mμ (profil U.V.) et de radioactivité sont indiqués dans la figure 3 a.

Le profil U.V. est caractérisé par la présence d'un pic supplémentaire plus ou moins important, s'ajoutant aux constituants classiques habituels du RNA (28 S, 18 S et 4 S) et localisé entre les constituants 18 S et 4 S. L'analyse de ce pic supplémentaire révèle qu'il renferme du DNA. Le dosage du désoxyribose par la méthode de BURTON (1956), confirme la présence de DNA dans des proportions de 9 à 12 p. 100 des acides nucléiques totaux.

Le profil de radioactivité montre la présence d'un pic polydisperse, dont le maximum coïncide avec le pic U.V. correspondant au DNA.

(β) Méthode d'extraction de SPORN et DINGMAN.

Les profils U.V. et de radioactivité sont représentés dans la figure 3 b.

Le profil U.V. est caractérisé par la présence de trois pics : les pics 28 S et 18 S du RNA ribosomal et le pic 4 S du RNA de transfert.

La radioactivité apparaît au niveau des constituants du RNA ribosomal et au niveau des constituants plus lourds que ce dernier (la dénomination de constituants lourds ou de fraction lourde ne préjuge en rien du poids moléculaire de ces RNA à marquage rapide, comme nous le verrons dans le chapitre suivant). Le profil est relativement polydisperse et semble résulter de la superposition de deux constituants.

Le RNA extrait par cette méthode est relativement pur, comparé au RNA extrait par la technique précédente. Le pourcentage de DNA contaminant est extrêmement faible, de l'ordre de 0,1 à 0,2 p. 100.

(γ) Méthode d'extraction de SCHERRER et DARNELL

La figure 3 c montre les profils d'absorption dans l'U.V. et de radioactivité.

On retrouve les profils U.V. correspondant aux trois pics 28 S, 18 S et 4 S. Mais comme dans le cas du RNA cytoplasmique, on constate une certaine tendance à la poly-

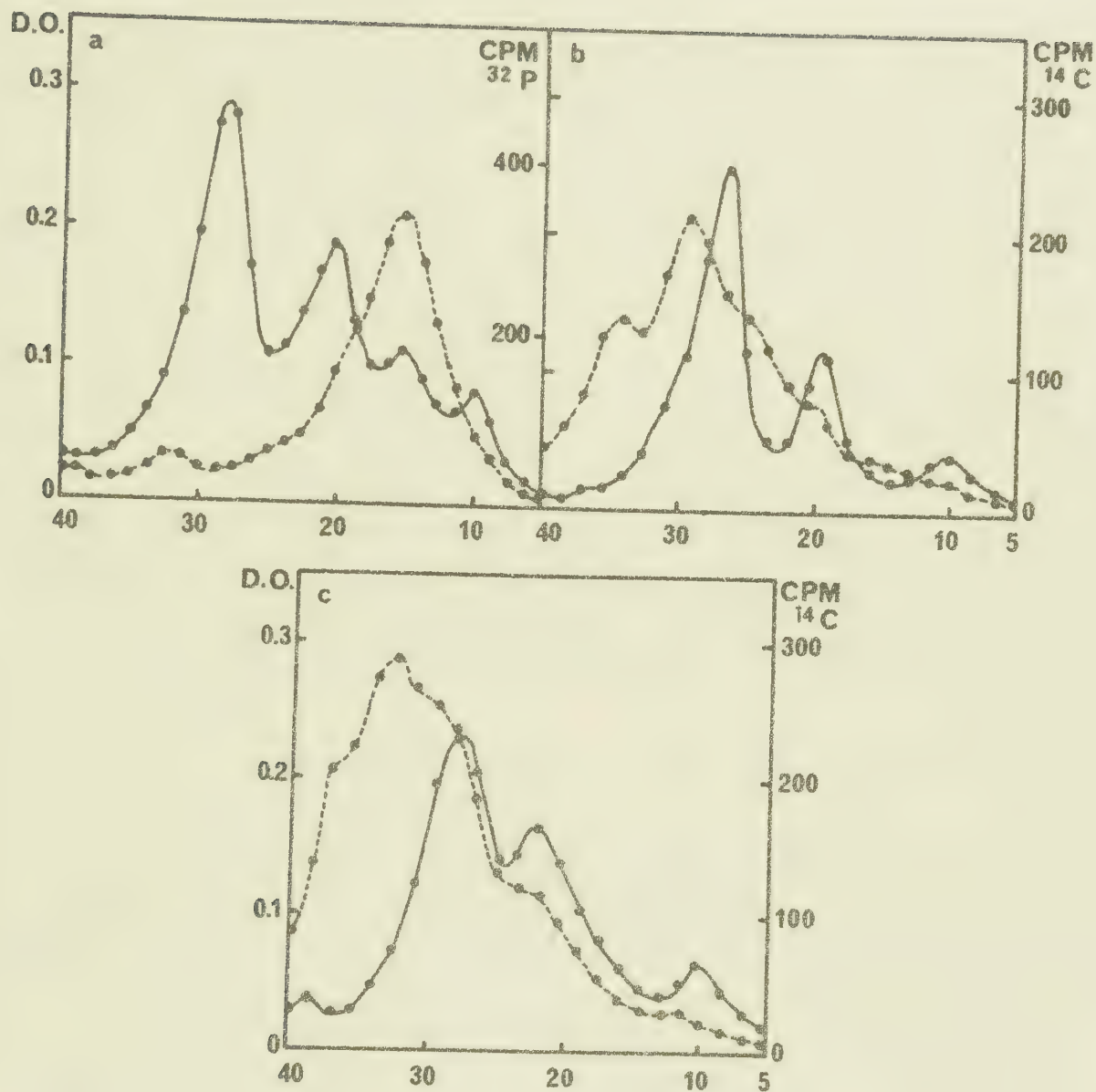


Fig. 3 - RNA extraits à partir de culots nucléaires bruts.

- a. - par la technique de MONIER.
- b. - par la technique de SPORN.
- c. - par la technique de SCHERRER.

dispersité et une augmentation sensible du constituant 18 S par rapport au constituant 28 S. Le profil de radioactivité est comparable à celui du RNA obtenu par la technique de SPORN et DINGMAN.

b) Noyaux préparés par la méthode de CHAUVEAU et coll.

(α) Méthode d'extraction de MONIER et coll.

Les profils U.V. et de radioactivité sont indiqués dans la figure 4 a.

On retrouve ici le pic de DNA déjà observé dans le cas des culots nucléaires bruts, mais en proportion plus importante par rapport au RNA. On observe d'ailleurs, lors de la précipitation par l'éthanol, l'apparition d'un précipité fibreux caractéristique du DNA. Cette contamination de DNA est très importante et peut atteindre 60 p. 100 des acides nucléiques totaux. Là encore, le profil de radioactivité se superpose sensiblement au pic de DNA.

(β) Méthode d'extraction de SPORN et DINGMAN.

Comme le montre la figure 4 b, les profils U.V. et de radioactivité sont comparables à ceux obtenus avec les culots nucléaires bruts extraits par la même méthode. Toutefois, l'extraction du RNA à partir des noyaux préparés selon la méthode de CHAUVEAU et coll. conduit à l'obtention de quantités de RNA nettement plus faible : 1 à 1,2 mg de RNA par foie, au lieu de 5 à 6 mg dans le cas des culots nucléaires bruts. Cette diminution du taux de RNA extrait tient d'abord au fait que les noyaux isolés par cette technique sont moins nombreux mais surtout au fait qu'ils sont débarrassés d'une grande partie de contaminants cytoplasmiques. Ceci explique également que l'activité spécifique du RNA est beaucoup plus élevée.

La contamination par le DNA est faible, de l'ordre de 1 à 2 p. 100, malgré la quantité importante de DNA présent dans le matériel nucléaire de départ.

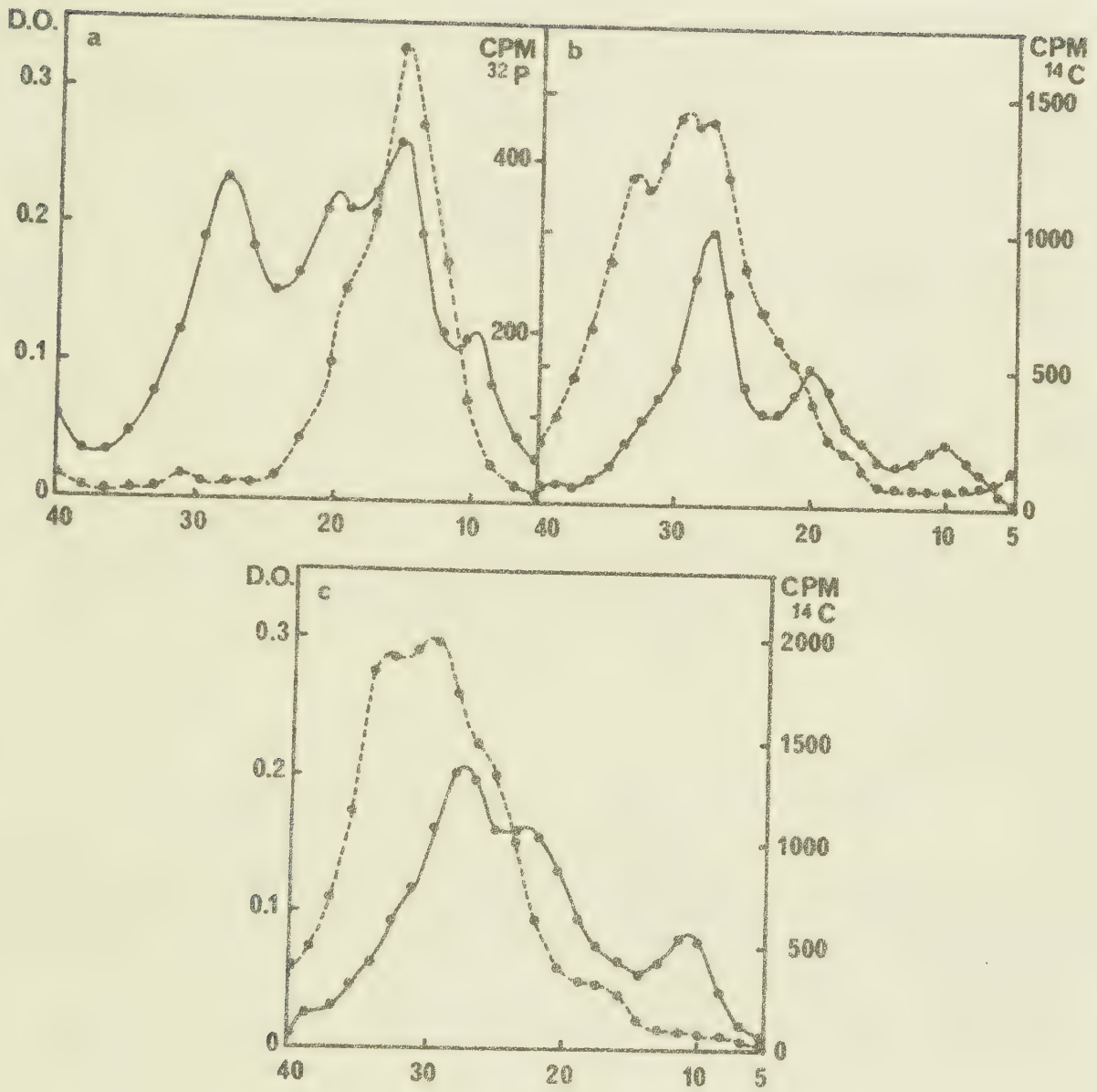


Fig. 4 - RNA extraits à partir de noyaux préparés selon la méthode de CHAUVEAU et coll.

a. - par la technique de MONIER

b. - par la technique de SPORN

c. - par la technique de SCHERRER

(γ) Méthode d'extraction de SCHERRER et DARNELL.

La figure 4 c montre les profils d'absorption à l'U.V. et de radioactivité.

Ils sont en tous points comparables à ceux obtenus avec les culots nucléaires bruts extraits par la même méthode. Là aussi, les différences résident au niveau de la quantité de RNA extraite plus faible et de la radioactivité spécifique plus élevée.

c) Noyaux préparés par la méthode de ZALTA et coll.

(α) Méthode d'extraction de MONIER et coll.

Le profil U.V. est essentiellement constitué d'un pic unique sédimentant dans la zone de 18 S à 4 S, en prenant comme référence la position des pics du RNA cytoplasmique total. Le profil de radioactivité se superpose à ce pic. Le dosage par la méthode de BURTON montre qu'il renferme une proportion importante de DNA.

(β) Méthode d'extraction de SPORN et DINGMAN.

Les profils sont indiqués dans la figure 5 a.

Le profil d'absorption à 260 mμ est variable selon la préparation. On observe toujours un large pic dans la zone comprise entre 18 S et 4 S. En général, ce pic est accompagné d'épaulements plus ou moins importants au niveau des constituants 28 S et 18 S du rRNA. Dans certaines préparations, ces pics ou épaulements sont pratiquement inexistants. Dans tous les cas, le profil de radioactivité se situe au niveau du pic principal sédimentant dans la zone de 18 S à 4 S.

Contrairement au RNA obtenu par la méthode de MONIER et coll., le RNA extrait par la méthode de SPORN et DINGMAN n'est plus contaminé que par de faibles quantités de DNA.

(γ) Méthode d'extraction de SCHERRER et DARNELL.

La figure 5 b montre les profils obtenus.

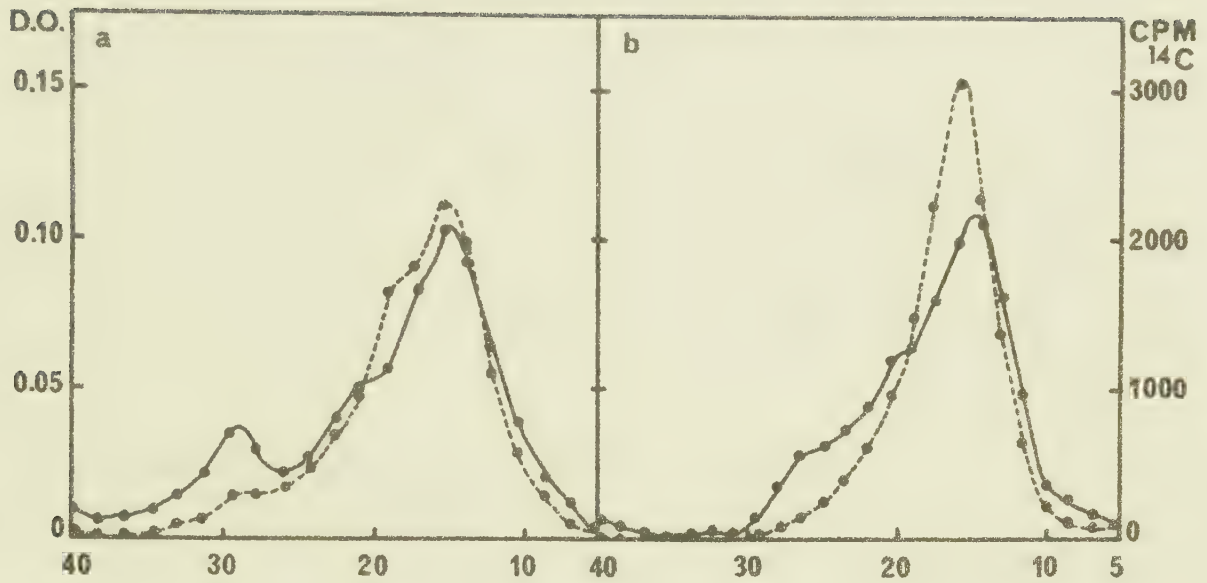


Fig. 5 - RNA extraits à partir de noyaux préparés selon la méthode de ZALTA et coll.

a. - par la technique de SPORN.

b. - par la technique de SCHERRER.

L'extraction phénolique à chaud ne permet à aucun moment d'obtenir un profil U.V. caractéristique du rRNA. On n'observe la présence que d'un seul pic polydisperse, présentant un maximum au niveau des constituants 13 S. La radioactivité se superpose au profil d'absorption à l'U.V.

Ces RNA ne contiennent pas de quantités décelables de DNA. Le rendement total, comparable à celui obtenu avec la méthode de SPORN et DINGMAN est très faible, entre 0,45 et 0,50 mg de RNA pour un foie, soit environ trois fois moins que lors de l'extraction du RNA des noyaux de type CHAUVEAU. L'activité spécifique est par contre très élevée, environ double de celle du RNA extrait à partir des noyaux purifiés par la méthode de CHAUVEAU et coll.

3. Etude du RNA nucléaire de foie de rats hypophysectomisés

Une étude similaire à celle que nous venons de décrire pour le RNA de foie de rats normaux a été effectuée avec des RNA nucléaires de foies de rats hypophysectomisés.

Quelle que soit le degré de pureté des noyaux étudiés (culot nucléaire brut ou noyaux purifiés) et la méthode d'extraction du RNA employée, aucune différence qualitative n'a pu être mise en évidence dans les divers profils de sédimentation par rapport au RNA de foies de rats normaux.

Les seules modifications observées sont de nature quantitative au niveau de la radioactivité. L'activité spécifique des RNA de foie de rats hypophysectomisés est systématiquement plus faible (environ 40 p. 100) que dans le cas des foies de rats normaux.

Discussion :

Comme dans le cas du RNA cytoplasmique, les différences trouvées dans la comparaison des RNA nucléaires des foies de rats normaux ou hypophysectomisés ne sont pas de nature qualitative mais de nature quantitative : l'activité spécifique des RNA nucléaires de foies de rats hypophysectomisés est nettement plus faible par rapport à celle trouvée dans le cas des foies de rats normaux. Ceci montre que le renouvellement métabolique des RNA nucléaires est moins rapide dans le foie des animaux hypophysectomisés.

En ce qui concerne les caractéristiques des RNA nucléaires on trouve, en fonction de la méthode de purification des noyaux et de la méthode d'extraction des RNA, des différences importantes. Ce résultat pose un certain nombre de problèmes concernant les RNA nucléaires, que nous traiterons au prochain chapitre.

CHAPITRE V

PROBLEMES POSES PAR LES RNA NUCLEAIRES

L'examen des résultats du chapitre IV amène à poser deux grands problèmes : d'une part, le problème de la présence de RNA ribosomal et de RNA de transfert dans le noyau ; d'autre part, le problème de la signification des RNA à marquage rapide.

1. Problème de la présence de RNA ribosomal et de RNA de transfert dans le noyau

La quantité de RNA extraite par les diverses techniques à partir du matériel nucléaire dépend du degré de pureté des noyaux. Cette quantité est assez importante dans le cas des culots nucléaires bruts. Elle est nettement inférieure dans le cas de noyaux purifiés. Ceci soulève la question de la contamination des RNA nucléaires par les RNA cytoplasmiques.

L'examen microscopique des culots nucléaires bruts montre en effet que ceux-ci sont largement contaminés par des fragments cellulaires et des débris cytoplasmiques. De même, nous avons vu (chapitre I, paragraphe 2 a) que les noyaux purifiés par la méthode de CHAUVEAU et coll. ne peuvent pas être considérés comme parfaitement propres : l'examen au microscope électronique montre qu'il subsiste une couronne ergastoplasmique périnucléaire riche en grains de Pallade. Par contre, les noyaux de type ZALTA peuvent être considérés comme pratiquement dépourvus de contaminations cytoplasmiques. En effet, l'examen au microscope électronique montre une desquamation sélective du feuillet externe de la double membrane nucléaire, les noyaux étant ainsi débarrassés de la quasi-totalité des fragments ergastoplasmiques périnucléaires.

Ces observations cytologiques peuvent expliquer certaines différences observées dans les profils de sédimentation des RNA en fonction de la pureté des noyaux.

Les RNA préparés à partir de culots nucléaires bruts ou de noyaux purifiés par la méthode de CHAUVEAU et coll. présentent après sédimentation le profil d'absorption dans l'U.V. caractéristique des RNA cytoplasmiques : les pics 28 S et 18 S du RNA ribosomal et le pic 4-5 S du RNA soluble.

Par contre, le profil U.V. correspondant aux RNA extraits à partir de noyaux très purs, préparés par la méthode de ZALTA et coll., est caractérisé par la présence d'un pic prédominant dans la zone comprise entre 18 S et 4 S, les constituants correspondant au RNA cytoplasmique paraissant de ce fait totalement absents ou présents en très faibles quantités seulement.

Ce résultat pose le problème de la présence de RNA ribosomal et de RNA de transfert dans les noyaux. On peut en effet se demander si les pics correspondant à ces RNA dans les profils de sédimentation des RNA extraits à partir de culots nucléaires bruts et des noyaux de type CHAUVEAU ne proviennent pas du RNA cytoplasmique.

Cette interprétation ne concorde pas avec les résultats de la plupart des travaux effectués sur le RNA nucléaire de tissus de mammifères qui concluent à la présence, dans le noyau, de RNA ribosomal et de RNA de transfert en proportion relativement élevées (PHILIPSON, 1961 ; HARSHAW et coll. 1962 ; HIATT, 1962 ; KENNEY et coll. 1963 ; SPORN et DINGMAN, 1963 ; GEORGIEV et coll. 1963 ; BRAWERMAN et coll. 1963) sans toutefois qu'il soit possible de se rendre compte de la pureté des préparations de noyaux utilisées par ces auteurs. Il faut pourtant signaler que certains, tout en relatant la présence de RNA ribosomal, n'ont pas observé la présence de RNA de transfert dans les noyaux (MAGGIO et coll., 1963 ; HARRIS et coll., 1963 ; WINTZERITH, 1965). De plus, l'existence de ribosomes nucléaires est encore discutée. Leur présence a été décrite par certains auteurs (RENDI, 1960 ; POGO et coll., 1962 ; TAKAMOTO, 1963 ; ELAEV et RYKHLIK, 1963 ; WINCKELMANS et coll., 1964 ; Mc CARTHY et coll., 1966) tandis que d'autres contestent l'existence de ces particules dans les noyaux et considèrent qu'il s'agit de fragments de chromatine (PALLADE et coll., 1963 ; CRAWLEY et HARRIS, 1963). L'absence de RNA ribosomal en quantité appréciable dans les préparations nucléaires purifiées selon la méthode de ZALTA et coll. pourrait être en accord avec l'opinion de ces derniers auteurs.

Une autre interprétation possible de l'absence de RNA ribosomal et de RNA de transfert dans les préparations obtenues à partir des noyaux de type ZALTA réside dans la possibilité de perte de ces RNA par diffusion dans les différentes solutions au cours de la purification des noyaux par cette technique. Rappelons à ce sujet que le traitement par les agents tensio-actifs provoque une rupture du feuillet externe de la membrane nucléaire, ce qui pourrait faciliter la fuite de matériel intranucléaire. Cependant, nous avons observé au microscope électronique que le feuillet interne de la membrane nucléaire des noyaux ainsi traités est continu et ne semble pas présenter de pores. De plus, l'aspect morphologique du contenu nucléaire suggère qu'il n'y a pas de départ appréciable de nucléoprotéines au cours de la purification. De leur côté, ZALTA et coll. (1962) ont montré que certaines activités enzymatiques sont conservées dans ces noyaux. Enfin, nous avons vu (chapitre I) que la capacité d'incorporer les aminoacides dans les protéines était également conservée. On peut conclure de ces observations qu'un départ de particules ribosomales des noyaux semble dans ces conditions assez improbable.

En fait, l'effet le plus remarquable de la technique de purification des noyaux au Cémulsol consiste, du point de vue cytologique, dans la disparition de la couronne ergastoplasmique périnucléaire. Cette disparition se traduit parallèlement par la diminution du RNA ribosomal dans les extraits nucléaires. Nous avons vérifié que le traitement par le Cémulsol de noyaux incomplètement purifiés conduisait réellement à l'élimination de RNA de type ribosomal. Nous avons préparé des culots nucléaires bruts d'une part, et des noyaux selon la technique de CHAUVEAU d'autre part. Ces noyaux ont été repris et purifiés par un traitement au Cémulsol. Nous avons extrait le RNA des solutions de détergent après sédimentation des noyaux. La quantité de RNA extractible à partir de ces solutions était, dans tous les cas, nettement supérieure à la quantité de RNA restant dans les noyaux (2 à 3 fois supérieure dans les cas des noyaux de type CHAUVEAU ; 10 à 15 fois dans le cas des culots nucléaires bruts). Ce résultat montre l'importance de l'erreur que peut entraîner une purification incomplète des noyaux.

Le profil de sédimentation en gradient de saccharose du RNA extrait de la solution obtenue en traitant les noyaux de foie par le Cémulsol est exactement superposable à celui du RNA cytoplasmique provenant des mêmes organes (figure 6). Nous avons vu qu'après un marquage de 20 minutes,

le RNA ribosomal cytoplasmique ne présente aucune radioactivité, tandis que le sRNA est faiblement marqué. Or, nous avons constaté que le RNA détaché des noyaux par le traitement au Cémulsol présente les mêmes caractéristiques. Dans les mêmes conditions expérimentales, le RNA nucléaire est fortement marqué ; on ne trouve pas de trace de ce composant dans le RNA enlevé des noyaux par le Cémulsol. On voit donc que le seul RNA éliminé par ce traitement est un RNA semblable au RNA cytoplasmique. Compte-tenu de l'élimination de la couronne ergastoplasmique périnucléaire, mise en évidence par la microscopie électronique, on peut raisonnablement penser que le RNA enlevé par le Cémulsol provient essentiellement de ce matériel périnucléaire. Si l'on suppose qu'il y a possibilité de départ de matériel intranucléaire, les résultats précédents montrent en tout cas que les noyaux n'ont pas subi une altération suffisante pour permettre le passage du RNA nucléaire à marquage rapide.

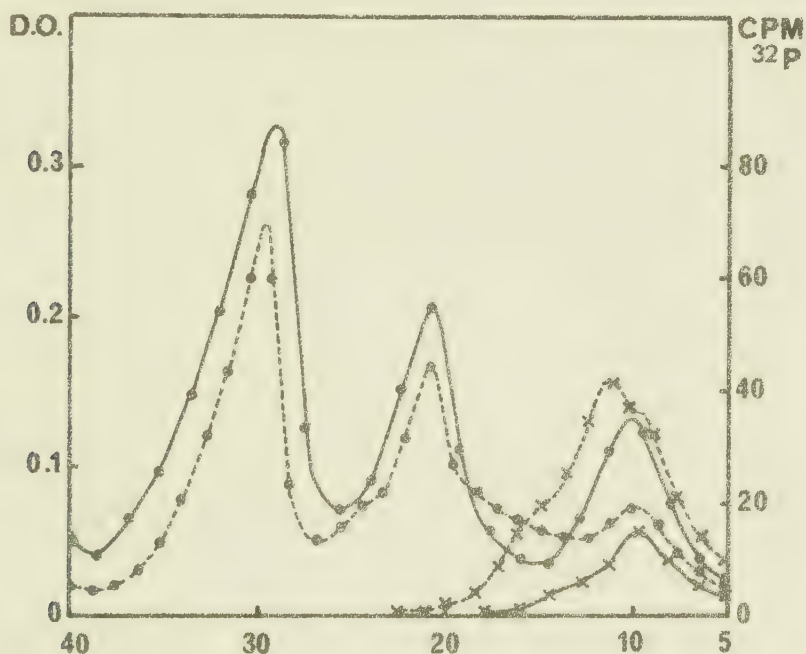


Fig. 6 - RNA cytoplasmique total (—) et RNA extrait à partir de la solution de Cémulsol (----) ayant servi à la purification des noyaux correspondants.
D.O. à 260 mμ (●—● et ●----●).
Radioactivité ³²P (x—x et x----x).
Les RNA ont été extraits par la technique de SPORN.

Dans des expériences préliminaires effectuées en collaboration avec le Professeur G. SIEBERT (1965), nous avons voulu comparer les résultats obtenus avec les noyaux préparés par la technique de ZALTA et coll. avec ceux trouvés par la technique de SIEBERT (1964). Cette dernière technique de purification des noyaux est basée sur l'emploi combiné de basses températures et de solvants organiques. Elle conduit à du matériel nucléaire très pur, dépourvu de contaminations cytoplasmiques, et permet de conserver intact l'équipement enzymatique des noyaux. Nous avons extrait le RNA à partir de noyaux de foie de rats préparés par cette technique au laboratoire du Professeur SIEBERT. Ces RNA présentent, après centrifugation en gradient de saccharose, un profil tout à fait comparable à celui obtenu à partir de noyaux préparés par la technique au Cémulsol (figure 7). Ce profil est caractérisé par la présence d'un pic prédominant situé sensiblement au même niveau, dans la zone 18 S à 4 S, que le pic majeur du RNA préparé à partir des noyaux de type ZALTA.

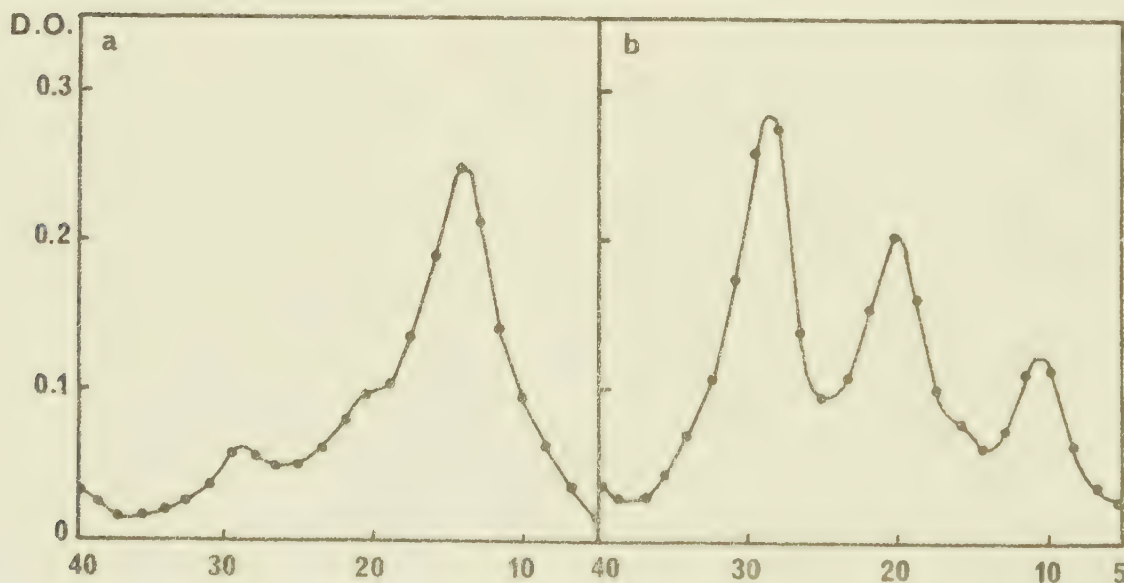


Fig. 7 - a) RNA extrait à partir de poudre nucléaire préparée selon la méthode de SIEBERT, par la technique de SPORN.

b) RNA extrait par la même technique, à partir de poudre cytoplasmique préparée dans les mêmes conditions.

Pour la poudre nucléaire le rapport RNA/DNA = 0,23.

Pour la poudre cytoplasmique le rapport RNA/DNA = 36,3.

Une dernière interprétation du profil de sédimentation particulier présenté par les RNA extraits à partir des noyaux de type ZALTA ou de type SIEBERT est, que ces RNA résultent d'une dégradation de composants de constantes de sédimentation plus élevées. Le déplacement de la radioactivité, observé dans les expériences effectuées avec les RNA des noyaux de type ZALTA, vers des constituants de constantes de sédimentation plus faibles, pourrait militer en faveur de cette interprétation. Par contre, le fait que le même profil de sédimentation soit obtenu avec les noyaux de type SIEBERT est plutôt en défaveur d'un tel processus de dégradation. En effet, toutes les étapes de la préparation de ces noyaux sont effectuées en milieu organique et la fraction cytoplasmique qui a subi le même traitement conduit à des RNA de type ribosomal intacts.

Il se pourrait aussi que cette dégradation éventuelle soit antérieure à l'extraction du RNA. Mais si les noyaux de type ZALTA contenaient un RNA déjà dégradé, leur capacité élevée d'incorporation des aminoacides serait d'autant plus remarquable. Ce résultat devrait alors être rapproché des travaux de ROZENCWAJG-LAHALLE et ZALTA (1965) effectués avec des noyaux de cellules d'ascite de Zajdela purifiés par la même technique et de ceux de SEKERI et coll. (1967) obtenus avec des noyaux de foie de rat purifiés par le Triton X-100, travaux qui, contrairement à ceux de McCARTHY et coll. (1966) sont en faveur d'un mécanisme de synthèse protéique nucléaire différent de celui qui se déroule au niveau des ribosomes cytoplasmiques.

2. Problèmes posés par les RNA nucléaires à marquage rapide

Les caractéristiques de sédimentation du RNA nucléaire à marquage rapide diffèrent selon le mode d'extraction du RNA et selon le degré de pureté des noyaux employés.

Lorsque la méthode d'extraction utilisée est celle de MONIER, nous avons vu que les préparations de RNA sont toujours contaminées par des quantités importantes de DNA. Dans ce cas, le RNA à marquage rapide se localise dans le gradient exclusivement au niveau de ce pic de DNA, c'est-à-dire dans la zone correspondant aux constituants 18 S à 4 S.

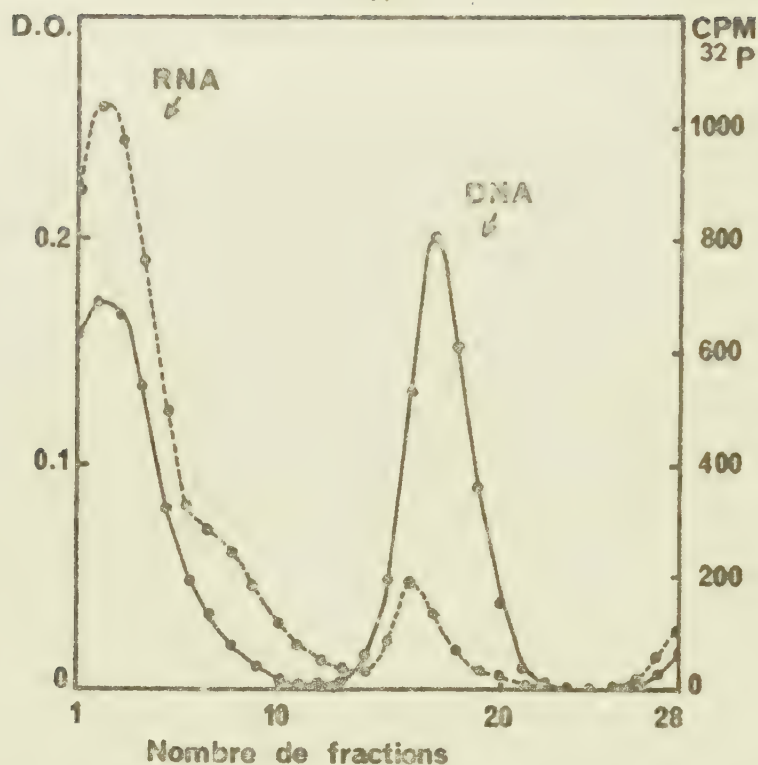


Fig. 8 - RNA extrait par la technique de MONIER, à partir de noyaux préparés selon la méthode de ZALTA. Gradient de densité de CsCl. Extrait centrifugé pendant 50h à 36.000 t/min. dans le rotor Spinco - SW 39.

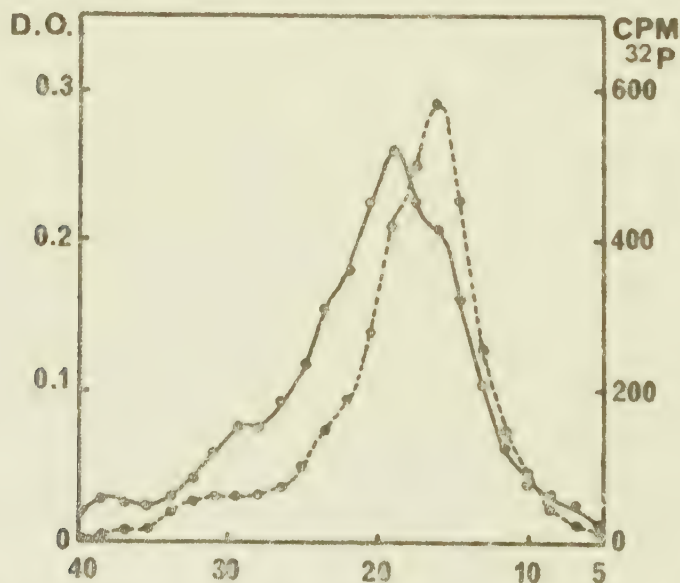


Fig. 9 - RNA extrait par la technique de MONIER à partir de noyaux préparés selon la méthode de ZALTA. Dans ce cas l'extrait a été centrifugé pendant 6h à 45.000 t/min. dans le rotor Spinco-SW50.

Cette superposition du profil de radioactivité et du profil U.V. du DNA pourrait s'interpréter par la formation d'un hybride DNA-mRNA. Nous avons essayé de vérifier cette hypothèse en soumettant la fraction DNA-RNA à marquage rapide à deux tests caractéristiques des hybrides. Le premier test a consisté en une analyse par centrifugation dans un gradient de densité de CsCl (selon la méthode de MESELSON et coll., 1957), dans lequel un hybride DNA-RNA migre comme un constituant unique. Or, cette analyse a montré (figure 8) que le RNA à marquage rapide se dissocie du DNA. Le deuxième test a consisté à soumettre la fraction considérée à l'action de la RNase pancréatique ; cet enzyme n'attaquant pas le RNA lorsque ce dernier est réellement engagé dans un hybride avec le DNA. L'expérience a montré (tableau II) que lors de ce traitement le RNA à marquage rapide est en majeure partie dégradé en composants acido-solubles.

T A B L E A U I I

Traitement d'un RNA nucléaire de foie de rat et
d'un RNA de levure par des quantités croissantes
de RNase pancréatique

	Quantité de RNA par essais (µg/ml)	Quantité de RNase ajoutée (µg/ml)	Radioactivité TCA précipitable (CPM ³² P)	% de Radioacti- vité TCA préci- pitable
RNA nucléaire de foie de rat	185	0	1513	100
	"	0,05	415	27,5
	"	0,5	205	13,5
	"	5	139	9
RNA de levure	216	0	1739	100
	"	0,05	488	28
	"	0,5	121	7
	"	5	27	1,5

Les conditions de traitement par la RNase sont celles décrites par CHAMBERLIN et BERG (1964). Le RNA nucléaire de foie de rat a été extrait par la méthode de SPORN et DINGMAN, à partir de noyaux préparés selon la technique de ZALTA et coll.

Il ne semble donc pas que cette fraction DNA-RNA à marquage rapide soit constituée par un véritable hybride. D'ailleurs, si l'on soumet cette fraction à une centrifugation en gradient de saccharose à des vitesses supérieures à celles couramment employées, on constate (figure 9) qu'il se produit un début de séparation du DNA et du RNA à marquage rapide.

Lorsque le RNA est extrait par les méthodes de SPORN et DINGMAN (1963) ou de SCHERRER et DARNELL (1962), à partir de culots nucléaires bruts ou de noyaux purifiés par la méthode de CHAUVEAU et coll. (1956), on constate que le RNA à marquage rapide apparaît au niveau de fractions lourdes, correspondant au RNA ribosomal et à des constituants plus lourds que ce dernier. Le profil de radioactivité ne consiste généralement pas en un pic unique, mais semble montrer la présence de deux constituants qui pourraient correspondre au RNA 45 S et 35 S décrits par différents auteurs, notamment par MURAMATSU et BUSCH (1965). Ces caractéristiques pourraient correspondre soit à un RNA messenger polycistronique comparable à celui décrit par SCHERRER et coll. (1966) dans le cas des erythrocytes de canard, soit au RNA précurseur du rRNA signalé par de nombreux auteurs. (Pour une revue de la question, voir GEORGIEV, 1966).

L'extraction des RNA par les techniques de SPORN et DINGMAN et de SCHERRER et DARNELL à partir de noyaux purifiés par la méthode de ZALTA et coll. (1962) conduit encore à des résultats différents. Nous avons vu que le profil d'absorption dans l'U.V. se limite dans ce cas à un pic unique sédimentant dans la zone comprise entre 18 S et 4 S. Ici, le RNA à marquage rapide apparaît au niveau de ce pic et on ne trouve pas de radioactivité au niveau des constituants lourds.

On aboutit donc au résultat, que le profil de sédimentation des RNA à marquage rapide varie suivant le degré de purification des noyaux et également selon la méthode utilisée pour l'extraction du RNA.

Cette variabilité des caractéristiques du RNA nucléaire à marquage rapide, dans l'analyse par centrifugation en gradient de saccharose, se retrouve lorsque l'on étudie les travaux d'autres auteurs relatifs à ce problème. En effet, lorsque l'on examine les publications consacrées aux RNA nucléaires à marquage rapide isolés à partir de tissus de mammifères, on est frappé par l'extrême diversité

des résultats. Plusieurs travaux relatent la présence de RNA lourds à marquage rapide, de constante de sédimentation supérieure ou égale à 28 S (HIATT, 1962, REVEL et HIATT, 1964, WINTZERITH, 1965; HADJIVASSILIOU et BRAWERMAN, 1965, dans le foie de rat; GEORGIEV et coll., 1963, dans le foie de rat et les cellules d'ascite d'Ehrlich de la souris; HAREL et coll., 1963, dans les cellules d'ascite tumorale de la souris; SCHERRER et DARNELL, 1962, dans les cellules Hela; YOSHIKAWA-FUKUDA, 1965, dans les cellules F.L. en culture). D'autres, au contraire, décrivent des RNA à marquage rapide légers, de constante de sédimentation comprise entre 18 S et 4 S (KENNEY et KULL, 1963, BRAWERMAN et coll., 1963, dans les noyaux de foie de rat; WELLING et coll., 1965, dans les noyaux de foie de rat en régénération; MUNRO et KORNER, 1962, TSANEV et coll., 1966, dans le foie de rat; TRAKATELLIS et coll., 1964, dans le foie de rat et le foie de souris; MONIER, 1962, dans l'hépatome du rat; COOLSMA et coll., 1963, dans le foie de poulet). D'autres encore, trouvent un ensemble polydisperse de RNA à marquage rapide, s'échelonnant depuis des fractions légères jusqu'à des fractions lourdes. (KIDSON et coll., 1963, dans le foie de rat normal; DIGIROLAMO et coll., 1964, dans les noyaux de foie de rat; TALWAR et coll., 1964, dans les noyaux de foie de rats normaux et de rats traités à l'hormone somatotrope; KRANTZ et coll., 1965, dans la moelle osseuse du rat; CHENG, 1961, dans des cellules amniotiques; PERRY, 1962, dans des fibroblastes en culture).

Lorsque l'on confronte nos propres travaux et ceux des auteurs précédents, on constate d'un travail à l'autre des variations dans les méthodes employées, tant pour la préparation des fractions nucléaires, pour l'extraction des RNA, que pour l'analyse des RNA nucléaires obtenus. Cette constatation nous a amené à nous demander si les causes de la variabilité des résultats ne devaient pas être recherchées au niveau de facteurs méthodologiques. Nous avons donc étudié l'influence de toute une série de facteurs intervenant au cours des différentes étapes de la préparation des RNA nucléaires à marquage rapide, sur leur comportement dans l'analyse par centrifugation en gradient de saccharose.

3. Influence de divers facteurs susceptibles d'intervenir dans la configuration des RNA à marquage rapide

Les facteurs étudiés se placent aux niveaux suivants :

- conditions physiologiques lors du prélèvement des foies
- facteurs intervenant dans la phase d'isolement et de purification des noyaux
- facteurs intervenant dans la phase d'extraction des RNA
- conditions d'analyse des RNA par centrifugation en gradient de saccharose.

Cette étude a été effectuée avec les deux méthodes d'extraction de SPORN et DINGMAN et de SCHERRER et DARNELL. Nous n'avons pas étudié l'incidence de ces facteurs sur les résultats fournis par la méthode de MONIER et coll., étant donné que celle-ci entraîne des quantités importantes de DNA.

a) Conditions physiologiques lors du prélèvement des foies

(α) Anesthésie des rats.

Nous avons anesthésié des animaux à l'éther ou au pentobarbital et nous avons comparé le RNA extrait à partir de noyaux de foie de ces rats avec le RNA nucléaire de foie d'animaux décapités, non anesthésiés. L'analyse de ces RNA en gradient de saccharose ne permet pas d'observer de différences, ni qualitatives, ni quantitatives. Il faut cependant signaler que GROSSPELIUS et ORRENIUS (1967) ont montré que l'activité de la RNA polymérase de foie de rat double après l'injection de phénobarbital, mais l'effet ne se manifeste que 6 à 8 heures après l'injection.

(β) Perfusion des foies.

S'il est vrai que la perfusion des foies permet un refroidissement rapide du tissu hépatique tout en éliminant la plus grande partie du sang de l'organe, il ne semble

pas qu'elle joue un rôle déterminant dans l'obtention d'un RNA à marquage rapide lourd, à condition de diminuer au maximum le temps qui s'écoule entre la décapitation de l'animal et l'immersion du foie à 0°C dans le tampon habituel de perfusion et de broyage (solution A). D'autre part, aucune différence n'apparaît lorsque l'on perfuse le foie par la veine porte ou par la veine cave inférieure. Il semble bien que ce soit essentiellement la plus ou moins grande rapidité du prélèvement qui explique certaines modifications du profil de sédimentation du RNA à marquage rapide : des images de dégradation commencent à apparaître lorsque le temps entre la mort de l'animal et l'immersion du foie à 0°C dépasse une minute.

(γ) Conservation des foies après le prélèvement.

La conservation des foies perfusés, entiers, pendant 5 heures à 0°C dans la solution A, additionnée ou non de PVS, n'empêche pas l'obtention à partir des noyaux d'un RNA à marquage rapide lourd. Par contre, lorsque l'on conserve dans les mêmes conditions un homogénat hépatique total dans la solution A, des différences importantes apparaissent dans les profils de RNA extraits, suivant que l'on ajoute ou non du PVS pour inhiber l'action de la RNase. En présence de PVS, le profil des RNA n'est pas modifié. Par contre, en absence de PVS, on observe une modification du profil de radioactivité et dans certains cas du profil U.V. se traduisant par une polydispersité plus grande et un déplacement vers les constituants de faibles constantes de sédimentation (figure 10).

Si au lieu de conserver les foies à 0°C dans la solution A, on les congèle à - 20°C dans la carboglace, ce traitement entraîne en général l'apparition de RNA à marquage rapide léger. Cette transformation semble essentiellement due à la phase de décongélation et elle peut être minimisée en effectuant celle-ci rapidement et en présence de PVS. Des observations similaires ont été également faites par HIGASHI et BUSCH (1965).

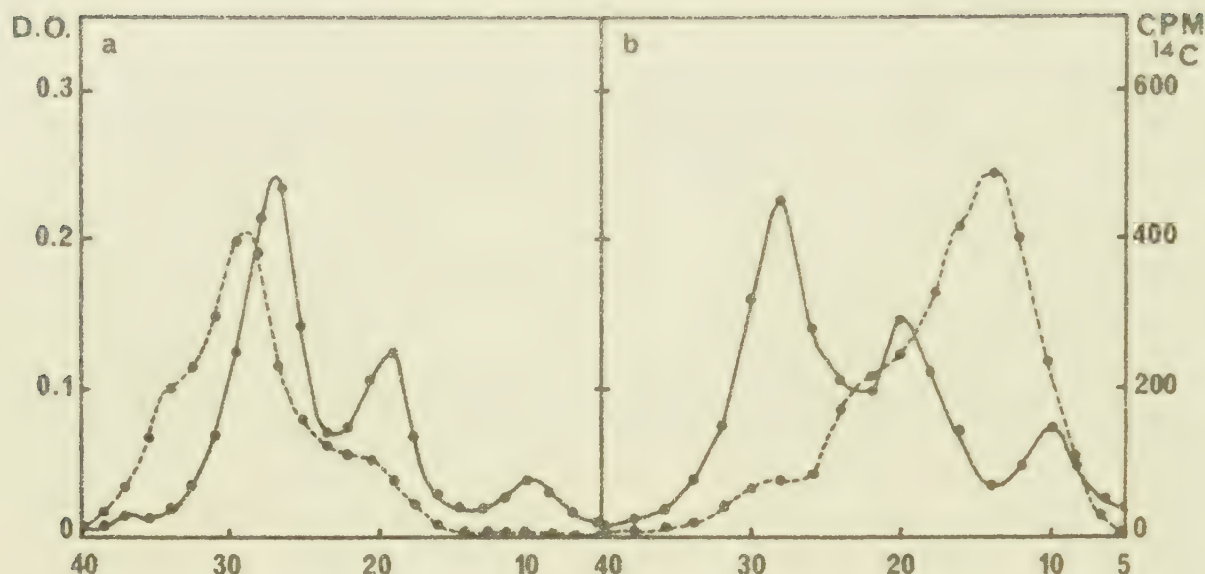


Fig. 10 - RNA extraits par la technique de SPORN et DINGMAN à partir de culots nucléaires bruts provenant :

- a. - de foies conservés entiers pendant 5h à 0°C dans la solution de perfusion A, sans PVS.
- b. - d'un homogénat hépatique conservé 5h à 0°C dans la solution A, sans PVS.

b) Facteurs intervenant dans la préparation des fractions nucléaires : répercussions de la modification de certaines conditions de la technique de ZALTA

Dans l'extraction des RNA à partir de noyaux préparés par la méthode de ZALTA et coll., nous n'avons jamais pu, contrairement aux résultats obtenus avec les culots nucléaires bruts ou avec les noyaux de type CHAUVEAU, mettre en évidence du RNA à marquage rapide lourd. Nous nous sommes demandés si ce résultat n'était pas imputable à certaines conditions particulières intervenant dans cette méthode. C'est ainsi que nous avons essayé d'ajouter à tous les milieux de purification le PVS, inhibiteur de la RNase, ou de remplacer le broyage peut-être trop vigoureux à l'Ultra-Turrax par le broyage plus doux dans l'homogénéiseur de Potter.

Rappelons que pour les culots nucléaires bruts et pour les noyaux de type CHAUVEAU, nous ajoutons du PVS à la concentration de 100 µg/ml dans les milieux d'homogénéisation.

Dans le cas de la méthode de ZALTA, nous avons constaté que cet inhibiteur ne pouvait pas être employé car, même à la concentration de 50 µg/ml, le PVS entraîne très rapidement la lyse des noyaux et leur agglutination bien avant le stade final de la purification.

Par ailleurs, le remplacement pour le broyage et les homogénéisations successives de l'Ultra-Turrax par l'appareil de Potter n'a pas amené de modifications dans les profils de sédimentation du RNA à marquage rapide. L'emploi de l'homogénéiseur de Potter est même à déconseiller dans cette technique, car nous avons constaté qu'il en résultait une purification moins bonne des noyaux. L'examen au microscope électronique révèle dans ce cas la persistance de contaminations cytoplasmiques périnucléaires.

c) Facteurs intervenant dans la préparation des
RNA

(α) Influence du tampon de dispersion et de lyse des noyaux.

La composition et le pH (dans les limites comprises entre 5,0 et 7,3) du tampon de dispersion et de lyse des noyaux ne semble pas modifier les caractéristiques de sédimentation du RNA à marquage rapide.

(β) Influence du type d'homogénéiseur employé au cours de la lyse des noyaux.

Nous avons observé qu'en remplaçant, lors de la dispersion des noyaux, l'homogénéiseur de Potter par l'Ultra-Turrax dans le cas des culots nucléaires bruts et dans le cas des noyaux de type CHAUVÉAU, il en résulte généralement un déplacement dans le profil de sédimentation des RNA à marquage rapide lourds vers des constituants plus légers. Cependant, même lorsque la dispersion est réalisée avec l'homogénéiseur de Potter, le nombre de passages du piston doit être limité à 2 ou 3, car la durée de cette étape de dispersion ne doit pas dépasser 1 minute si l'on veut empêcher l'apparition d'un déplacement de la radioactivité vers la zone des composants légers.

(γ) Rôle de la reprécipitation alcoolique et de la dialyse du RNA.

Lorsque le RNA est précipité par l'éthanol une seule fois après l'extraction, on observe toujours après analyse dans un gradient de saccharose, une forte absorption au niveau des fractions légères (figure 11 a). Ce matériel peut être totalement éliminé, soit par une deuxième précipitation alcoolique, soit par une dialyse de 5 heures à 0°C (figure 11 b). La double précipitation ne produit aucune modification dans la sédimentation du RNA à marquage rapide. Par contre, la dialyse peut dans certains cas entraîner un déplacement de la radioactivité vers des fractions plus légères.

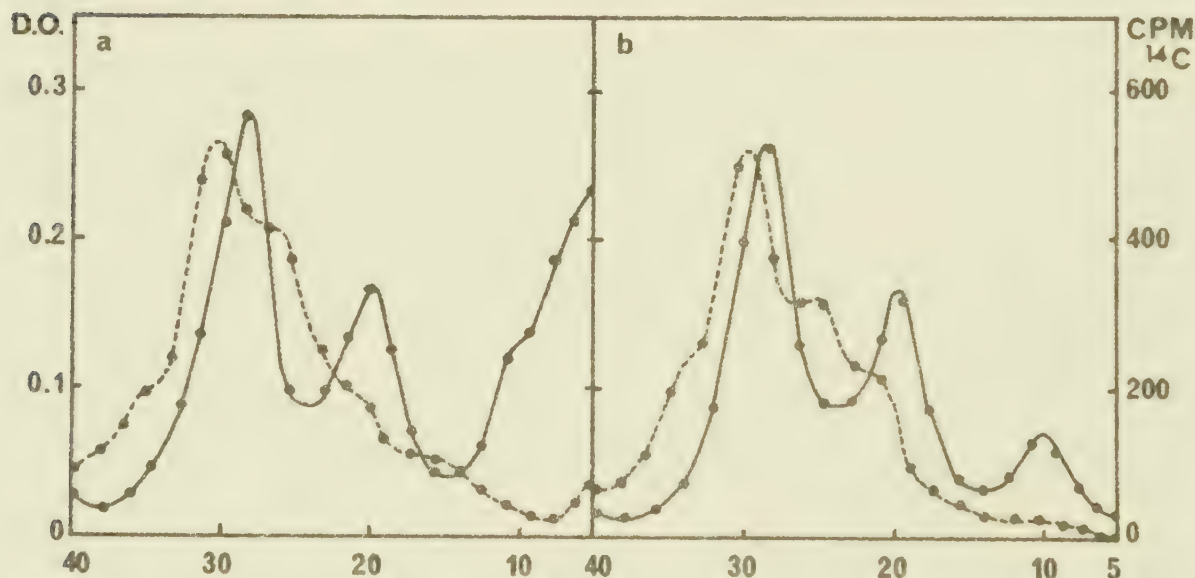


Fig. 11 - RNA extrait par la technique de SPORN et DINGMAN à partir de culots nucléaires bruts.

- a. - précipité une seule fois par l'éthanol à -20°C
- b. - précipité une seule fois par l'éthanol, puis dialysé pendant 24h contre un tampon Acétate de Potassium 0,1M contenant 10 µg/ml de PVS.

(δ) Rôle de la température d'extraction : possibilité de formation d'agrégats dans la méthode d'extraction à chaud.

Nous avons déjà vu que la méthode d'extraction à chaud de SCHERRER et DARNELL était la plus efficace pour l'extraction quantitative des RNA nucléaires à marquage rapide. Il est par ailleurs connu que cette technique est également la plus favorable pour l'obtention de RNA à marquage rapide lourd.

Un travail effectué avec les RNA de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et d' *E. coli*, nous a amené à nous demander si cette obtention de RNA lourd dans les techniques à chaud n'était pas le résultat d'un phénomène d'agrégation.

On sait que la méthode de MONIER et coll. à froid appliquée à la levure et à *E. coli*, conduit à l'extraction d'un RNA total composé des deux constituants du RNA ribosomal (26 S et 16 S pour la levure, 23 S et 16 S pour *E. coli*) et du RNA soluble 4-5 S. Dans le cas de la levure, le RNA à marquage rapide est polydisperse, s'étendant des fractions lourdes, au-delà du RNA ribosomal, jusqu'aux fractions les plus légères (figure 12 a). Dans le cas d'*E. coli*, le RNA à marquage rapide apparaît essentiellement au niveau du constituant 16 S (figure 13 a).

Nous avons constaté (BECK et coll., 1968) que lorsque la technique de SCHERRER et DARNELL est appliquée à ce matériel, il apparaît des modifications importantes dans le profil de sédimentation. A partir de la levure, on obtient en effet un RNA total dont le profil de sédimentation par rapport à celui du RNA préparé à froid est caractérisé par la présence d'un pic supplémentaire présentant une constante de sédimentation élevée de 32 S. Les constituants 16 S et 26 S sont présents dans un rapport identique à celui rencontré pour le RNA préparé à froid, c'est-à-dire environ de 1 à 3 ; le constituant 32 S représente 40 p. 100 du rRNA. Le marquage de la levure pendant un temps court par l'Uracile ¹⁴C fait apparaître un pic de radioactivité dont le maximum a une constante de sédimentation supérieure à 32 S. Ces fractions lourdes ne résultent pas d'une extraction supplémentaire d'un type particulier de RNA, car le rendement et la radioactivité spécifique du RNA obtenu à partir d'une même quantité de levure traitée à chaud ou à froid sont identiques.

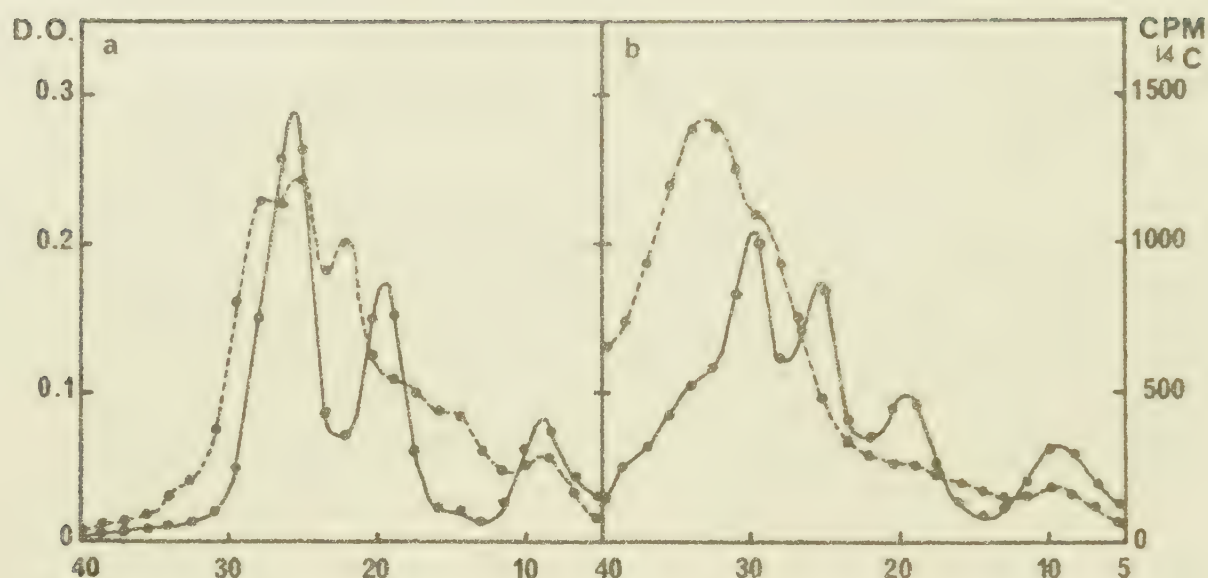


Fig. 12 - RNA de levure :

a. - extrait par la technique de MONIER

b. - extrait par la technique de SCHERRER

Marquage au ^{14}C -Uracile pendant 30 secondes

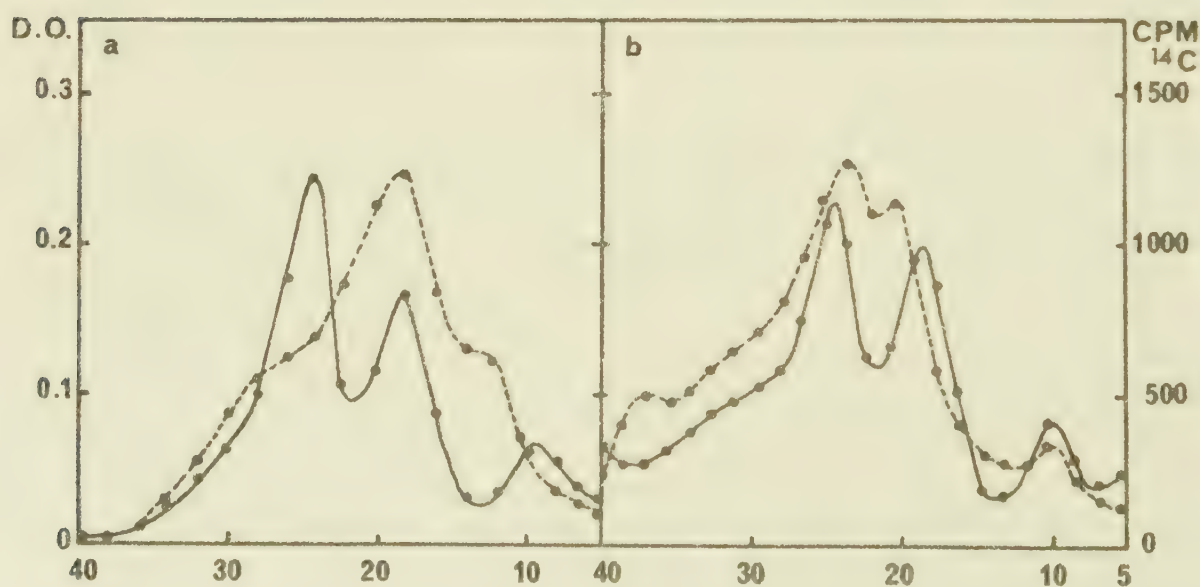


Fig. 13 - RNA d'E. coli :

a. - extrait par la technique de MONIER

b. - extrait par la technique de SCHERRER

Marquage au ^{14}C -Uracile pendant 30 secondes

Le profil de radioactivité ne se superposant pas au profil U.V. des fractions lourdes et vu l'importance de ces dernières quant à leur absorption dans l'U.V. (figure 12 b), il apparaît que l'on est en présence d'un phénomène d'agrégation entre différents types de RNA ou entre RNA et protéines, lors de l'extraction à chaud.

Dans le cas d'*E. coli*, le RNA préparé à chaud dans les mêmes conditions présente un phénomène d'agrégation nettement moindre (figure 13 b). Par rapport au RNA préparé à froid, on note une faible proportion de matériel lourd absorbant dans l'U.V., mais le RNA à marquage rapide, au lieu de sédimenter essentiellement au niveau du constituant 16 S, apparaît également dans la zone du gradient où séparent les constituants de poids moléculaire élevé.

Récemment, WAGNER et coll. (1967) ont décrit un phénomène d'agrégation semblable à celui que nous avons rencontré chez la levure lors de l'extraction par le phénol et le SDS à chaud du RNA ribosomal des cellules Hela.

Il semble donc que l'extraction à chaud conduise à un phénomène d'agrégation entraînant le RNA à marquage rapide. Cette agrégation pourrait être liée à la présence de substances non nucléiques dans le matériel de départ. En effet, le traitement à chaud, selon la technique de SCHERRER et DARNELL, effectué sur un RNA préalablement isolé à froid par la méthode de MONIER et coll., n'entraîne pas la formation des agrégats quelle que soit la concentration en RNA.

Nous avons essayé, dans le cas de la levure, d'empêcher cette agrégation, en agissant sur certains facteurs susceptibles de l'éviter. Ni la suppression du Mg^{++} ou sa complexation par l'EDTA, ni la modification de la nature de la concentration ionique et du pH du tampon, n'ont empêché la formation des agrégats. L'hypothèse d'une intervention de protéines dans la formation de ces agrégats a pu être écartée par le fait qu'une déprotéinisation ultérieure par la technique de SEVAG (1938) ou par l'action de la pronase n'a pas empêché leur présence.

Les agrégats ne peuvent être dissociés par action de la formaldéhyde, de l'urée, de l'éthylurée ou par passage dans un solvant organique après formation des nucléates d'ammonium quaternaire. Par contre, ils peuvent être dissociés par un traitement thermique suivi d'un refroidissement

brusque. Le RNA présente alors un profil identique à celui du RNA préparé à froid, aussi bien au point de vue de l'absorption dans l'U.V. qu'au point de vue de la radioactivité. Ce résultat montre donc bien que le pic 32 S, apparu après extraction à chaud du RNA de levure, était dû à l'agrégation des deux constituants 26 S et 16 S du rRNA. La radioactivité au niveau des fractions lourdes, apparue dans les mêmes conditions, résultait elle aussi d'un phénomène d'agrégation.

Il apparaît à la suite de ces expériences qu'une certaine prudence s'impose dans l'interprétation des résultats obtenus lors de l'utilisation de la méthode d'extraction à chaud de SCHERRER et DARNELL dans le cas des RNA de tissus de mammifères. Il est vrai que dans le cas des RNA de foie de rat extrait selon les modalités décrites, nous n'avons observé qu'exceptionnellement la formation d'un nouveau pic d'absorption dans l'U.V. de constante de sédimentation supérieure à 28 S. Comme nous l'avons vu, on n'observe qu'une certaine tendance à la polydispersité avec une augmentation relative du pic 18 S par rapport au pic 28 S.

On peut cependant se demander si le pic du RNA à marquage rapide d'environ 35 S observé avec les RNA de foie de rat extraits à chaud ne résulte pas d'une association d'un RNA à marquage rapide plus léger avec les constituants du RNA ribosomal.

Ce problème est important, car beaucoup d'auteurs considèrent ce RNA lourd comme une entité définie, constituant soit un RNA messager polycistronique, soit un RNA précurseur de haut poids moléculaire. A l'appui de l'hypothèse en faveur d'une agrégation, on peut mentionner le fait que l'application de la technique de SCHERRER et DARNELL aux noyaux de type ZALTA, où les constituants normaux du RNA ribosomal semblent être absents, ne permet pas de retrouver un marquage au niveau des fractions lourdes. Contre l'hypothèse d'une agrégation résultant de l'extraction à chaud, on peut mentionner le fait que le RNA à marquage rapide lourd apparaît également lorsque l'on réalise l'extraction par la technique de SPORN et DINGMAN, c'est-à-dire à la température ambiante de 22°C. Dans l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas possible de trancher en faveur de l'une ou de l'autre de ces hypothèses.

(e) Dissolution et conservation du RNA.

Que l'on dissolve le RNA avec de l'eau distillée, une solution de NaCl 0,1 M, du tampon acétate de potassium 0,1 M, du tampon Tris 0,025 M, en présence ou en l'absence de PVS, on ne remarque aucune modification du profil du RNA à marquage rapide dans un gradient de saccharose. Il est possible de conserver le RNA pendant plusieurs mois sous forme précipitée par 2 volumes d'éthanol à - 20°C et en présence d'ions Na⁺ ou K⁺, ou en solution aqueuse sous forme congelée sans qu'il apparaisse de modifications dans le profil de sédimentation.

d) Facteurs intervenant dans l'analyse par centrifugation en gradient de saccharose des RNA à marquage rapide

Dans un travail effectué avec des RNA nucléaire à marquage rapide de cellules Hela, BRAMWELL et HARRIS (1967) ont mis en évidence des différences dans les caractéristiques de sédimentation en gradient de saccharose de ces RNA suivant la force ionique du milieu de centrifugation. Nous avons réalisé une étude comparable avec des RNA nucléaires à marquage rapide de foie de rat.

(a) Conditions expérimentales.

Nous avons comparé les profils de sédimentation d'un même RNA nucléaire à marquage rapide dans différents gradients de concentration de saccharose de 5 à 40 p. 100, constitués avec des tampons de force ionique croissante. Par mesure de précaution, dans le but d'éviter l'apparition d'artéfacts consécutifs à la dégradation des RNA durant la centrifugation, nous avons ajouté dans toutes les solutions 10 µg/ml de PVS. De même pour empêcher tout phénomène d'agrégation éventuel par des ions bivalents, nous avons rendu (sauf indications contraires) tous les tampons 10 mM en EDTA. Les tampons que nous avons employés sont les suivants :

- tampon Tris-HCl, 25 mM à pH 7,3
- tampon Tris-HCl, 25 mM, NaCl 50 mM, pH 7,3
- tampon Tris-HCl, 25 mM, NaCl 350 mM, pH 7,3

Le tampon de référence est le tampon acétate de sodium décrit pour l'analyse des RNA en gradient de concentration de saccharose dans les conditions habituelles :

- tampon Acétate de Na 20 mM, NaCl 100 mM, pH 5,0.

Nous avons également étudié dans certains cas le comportement des RNA dans un gradient de saccharose en solution dans le tampon Tris-HCl 25 mM, pH 7,3, en l'absence d'EDTA.

Ces études ont été effectuées sur plusieurs types de RNA nucléaires à marquage rapide :

- RNA préparés à partir de culots nucléaires bruts par la technique de SPORN et DINGMAN ou de SCHERRER et DARNELL, dans les conditions optimales permettant l'obtention de RNA à marquage rapide lourds (figure 10 a).
- RNA préparés par les mêmes techniques, mais en absence de PVS et sans précautions de refroidissement du foie, conduisant à des RNA à marquage rapide légers (figure 10 b).

A titre de comparaison, nous avons également utilisé de l'acide polyuridylique marqué au ^{14}C .

(β) Résultats.

Une étude systématique effectuée avec les divers RNA et les divers tampons mentionnés ci-dessus, a conduit aux résultats suivants:

On observe dans les profils de sédimentation en gradient de saccharose, en fonction de la concentration ionique du milieu de centrifugation, un déplacement réversible des RNA à marquage rapide des zones de sédimentation des fractions légères vers les zones de sédimentation des fractions lourdes.

En prenant comme référence le profil obtenu dans le tampon acétate de sodium habituel, on assiste à un déplacement de la radioactivité vers les zones de sédimentation des fractions lourdes, dans deux circonstances :

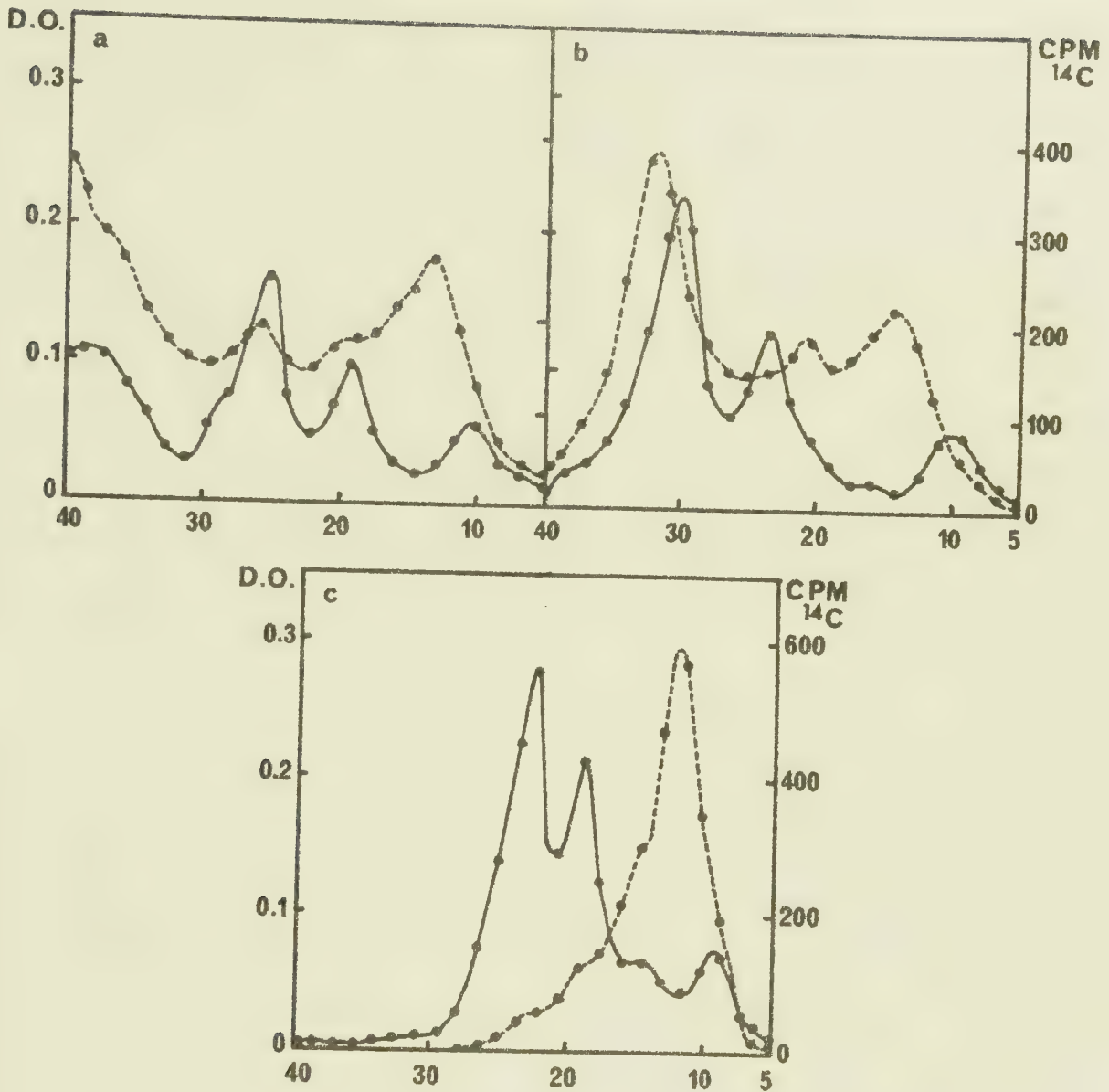


Fig. 14 - RNA extrait par la technique de SPORN et DINGMAN à partir de culots nucléaires bruts, analysé en gradients de saccharose constitués à base de tampons différents. (même RNA que celui de la fig. 10b)

- a. - Tampon Tris-HCl, sans EDTA
- b. - Tampon Tris-HCl, NaCl 350 mM
- c. - Tampon Tris-HCl, EDTA 10 mM

- d'une part en absence totale d'ions Na^+ dans le milieu de centrifugation (gradient constitué par le tampon Tris-HCl) à condition toutefois qu'il n'y ait pas d'EDTA (figure I4 a). Ce phénomène est en effet empêché par la présence d'EDTA (figure I4 c).
- d'autre part, lorsque la concentration en ions Na^+ est élevée. En effet, l'augmentation de la force ionique à 350 mM de NaCl dans le même tampon Tris-HCl, conduit à l'apparition de fractions marquées lourdes (figure I4 b).

Ce déplacement de fractions de RNA radioactives légères vers des fractions lourdes n'apparaît toutefois que si les RNA à marquage rapide sont en présence de RNA ribosomal intact. En effet, si le RNA marqué est en présence d'un rRNA dégradé, ce déplacement n'a pas lieu et le RNA marqué migre au niveau de ce RNA ribosomal dégradé. Ce phénomène est confirmé par les expériences relatées ci-après.

Nous avons préalablement isolé la fraction de RNA marqué légère et nous l'avons soumise à une nouvelle centrifugation dans des gradients de force ionique croissante. Dans ce cas, le RNA marqué ne subit aucun déplacement vers les zones de sédimentation des fractions lourdes. Si par contre, cette fraction préalablement isolée est mélangée à un rRNA nucléaire ou cytoplasmique intact non marqué et centrifugé dans les mêmes conditions, la radioactivité apparaît de nouveau au niveau des fractions lourdes (figures 15 a,b,c).

Il nous a semblé intéressant de vérifier si ce déplacement vers des zones de sédimentation plus lourdes dans le cas des concentrations ioniques élevées et en présence du rRNA intact avait également lieu avec un polynucleotide de synthèse. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de déplacement du poly U marqué vers les fractions lourdes ; ce dernier migre toujours au niveau des fractions 5 S.

Avec les RNA à marquage rapide lourds, préparés dans les conditions optimales qui permettent d'éviter la dégradation, la diminution de la force ionique dans le milieu de centrifugation n'entraîne pas de modifications importantes dans les caractéristiques de sédimentation du

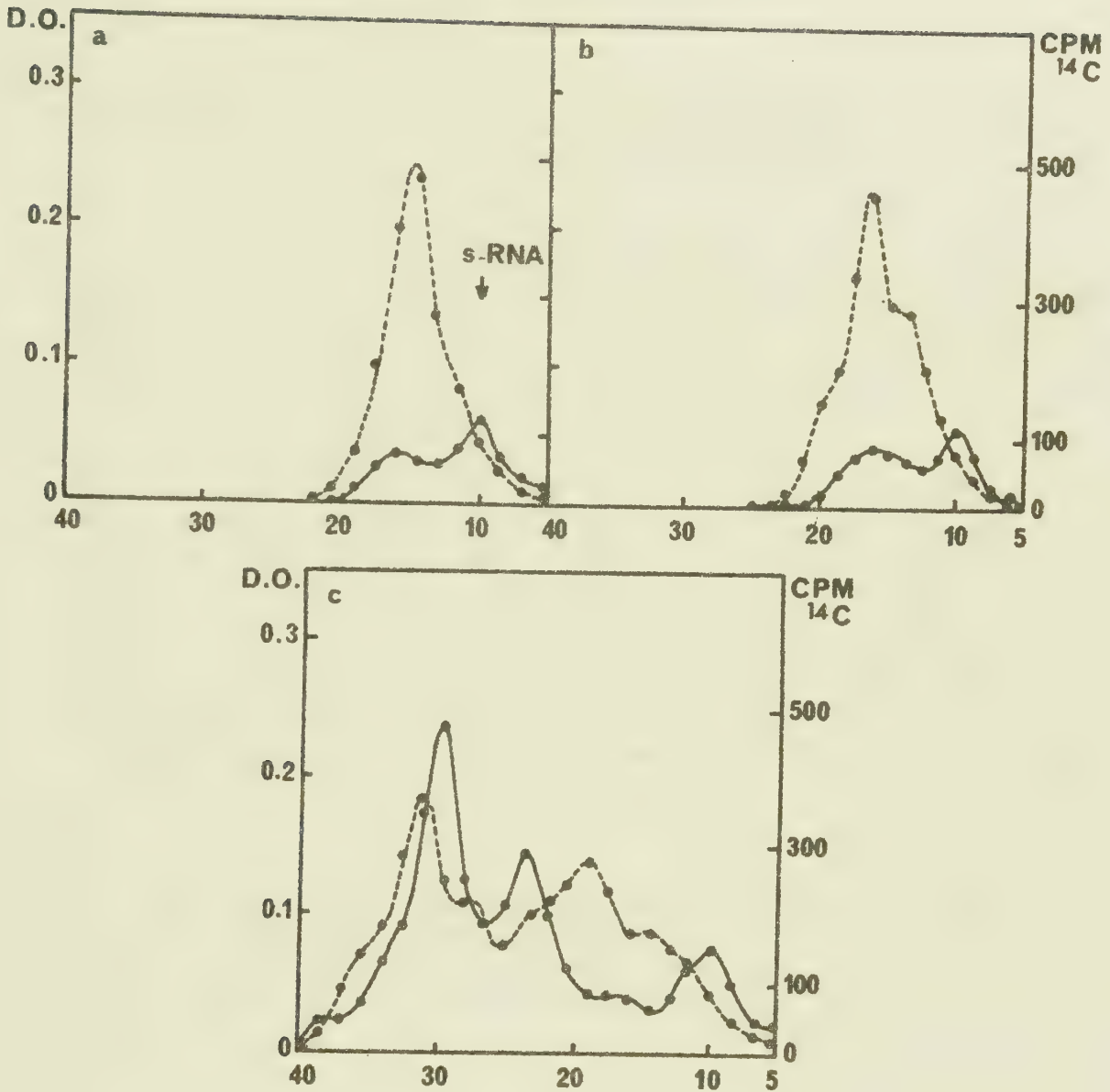


Fig. 15 - Fraction légère (de coefficient de sédimentation $< 18S$) d'un RNA nucléaire extrait par la technique de SPORN, préalablement isolée à partir d'un gradient de référence au tampon Acétate de sodium, pH 5,0 (Rotor SW-25.2), et recentrifugée dans un gradient :

- a. - à base de tampon Tris-HCl, NaCl 50 mM
- b. - à base de tampon Tris-HCl, NaCl 350 mM
- c. - à base de tampon Tris-HCl, NaCl 350 mM, en présence d'un RNA ribosomal nucléaire (Extraction SPORN) Intact non marqué ; la fraction légère étant préalablement mélangée au rRNA non radioactif.

RNA marqué. Le RNA à marquage rapide lourd ne subit qu'un faible déplacement vers la zone de sédimentation des fractions légères (figures 16 a, b).

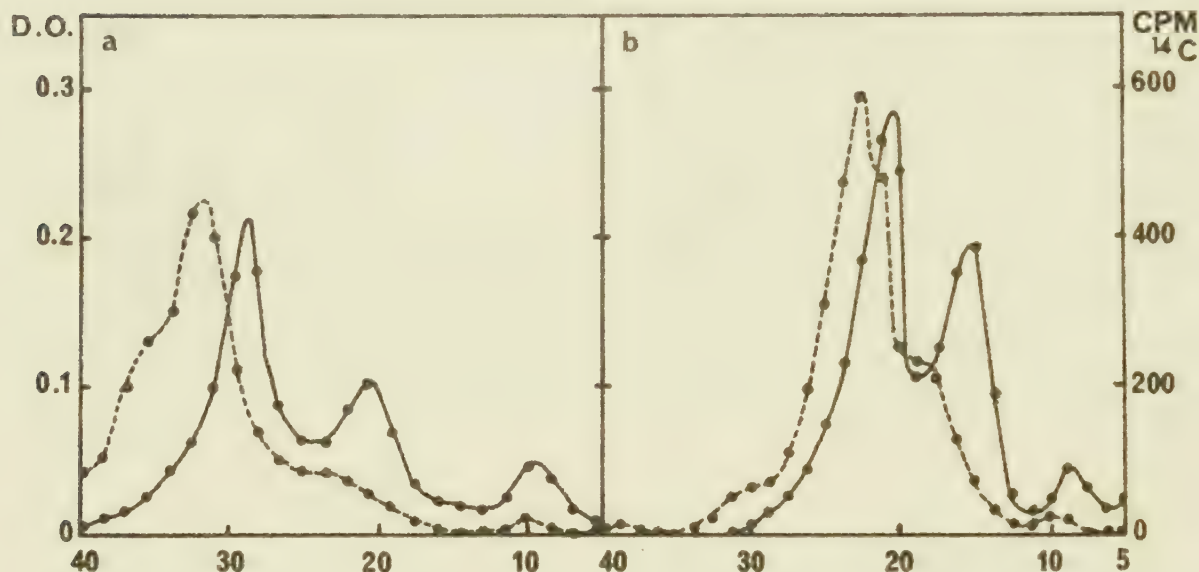


Fig. 16 - RNA extrait par la technique de SPORN à partir d'un culot nucléaire brut et analysé dans un gradient :
a. - à base de tampon Tris-HCl, NaCl 350 mM
b. - à base de tampon Tris-HCl, EDTA 10 mM

Remarque : Nous avons observé que la simple dissolution du RNA dans les différents tampons décrits ci-dessus ne suffit pas pour entraîner une modification du profil de sédimentation lorsque la centrifugation est effectuée dans le gradient constitué avec le tampon de référence. C'est la concentration ionique du milieu de centrifugation qui est déterminante.

DISCUSSION

Le principal résultat de cette étude des RNA nucléaires à marquage rapide est la grande variabilité de leurs caractéristiques de sédimentation selon le degré de pureté des noyaux employés et selon le mode d'extraction du RNA. Deux formes extrêmes de ces RNA à marquage rapide peuvent être observées : des RNA "lourds", se situant au niveau des RNA ribosomiques et au niveau de fractions plus lourdes, et des RNA "légers" se situant au niveau de fractions plus légères que le RNA ribosomal 18 S.

Les expériences que nous venons de rapporter montrent que le caractère "lourd" ou "léger" du RNA à marquage rapide peut être lié à toute une série de facteurs méthodologiques au niveau du prélèvement des organes, de la préparation des fractions nucléaires, de la méthode d'extraction des RNA ou de l'analyse même de ces RNA par centrifugation en gradient de saccharose. Il convient de tenir compte de ces facteurs dans l'interprétation des résultats quant à leur signification biologique.

De la localisation dans les gradients de concentration de saccharose des RNA à marquage rapide obtenus dans diverses conditions, on retire l'impression d'une corrélation avec la présence dans la préparation d'acides nucléiques de poids moléculaire plus ou moins élevé. C'est ainsi que dans la méthode de MONIER et coll. (1962), caractérisée par l'entraînement de DNA dans les extraits, on constate, quelle que soit la méthode de préparation des noyaux, que le RNA à marquage rapide se localise toujours au niveau du DNA. Les méthodes de SPORN et DINGMAN (1963) et de SCHERRER et DARNELL (1962) conduisent dans le cas des culots nucléaires bruts ou des noyaux préparés par la méthode de CHAUVÉAU à des RNA à marquage rapide lourds, se situant au niveau des RNA ribosomiques ou de fractions plus lourdes, lorsque toutes les précautions ont été prises pour maintenir l'intégrité moléculaire des RNA ribosomiques. Si les RNA ribosomiques sont partiellement dégradés, les RNA à marquage rapide migrent au niveau de ces RNA dégradés. Si l'on ajoute à ces RNA partiellement dégradés un rRNA intact, une partie du RNA marqué réapparaît au niveau des fractions lourdes à condition toutefois d'élever la force ionique. Il est intéressant de rappeler également que l'application des méthodes d'extraction de SPORN et DINGMAN et de SCHERRER et DARNELL à des noyaux préparés selon la méthode

de ZALTA, conduisant à des RNA caractérisés par l'absence des constituants normaux du rRNA, fournit également un RNA à marquage rapide léger se superposant au profil U.V.

On est ainsi amené à se demander si la position des RNA à marquage rapide dans les gradients est réellement liée à leur poids moléculaire ou si elle ne dépend pas de la présence des autres types d'acides nucléiques. La tendance à la formation d'agrégats au cours des extractions à chaud, que nous avons mis en évidence dans ce travail, pourrait être une indication en faveur d'une telle interprétation. Ainsi se trouveraient expliquées les données bibliographiques extrêmement variées et contradictoires relatives à la taille des RNA à marquage rapide dans les tissus des mammifères.

CONCLUSION

L'étude des RNA à marquage rapide cytoplasmiques et nucléaires, extraits de foies de rats normaux ou hypophysectomisés par trois types de méthodes (méthode de MONIER et coll., de SPORN et DINGMAN et de SCHERRER et DARNELL), nous permet de tirer un certain nombre de conclusions.

Dans le cas du RNA cytoplasmique, où le renouvellement métabolique est relativement lent et où le marquage rapide ne concerne que le triplet pCpCpA terminal des tRNA, aucune différence qualitative n'a pu être observée entre animaux normaux et hypophysectomisés. Les seules différences portent sur la quantité de RNA extraite, qui, chez les rats hypophysectomisés, est diminuée de 30 à 40 p. 100.

Le RNA nucléaire est caractérisé par un renouvellement rapide, se traduisant par un marquage précoce. Les RNA nucléaires de foie des animaux hypophysectomisés présentent une activité spécifique nettement plus faible que celle des RNA de foie de rats normaux. Mais quelle que soit la préparation nucléaire employée (culots nucléaires bruts, noyaux purifiés par la méthode de CHAUVEAU et coll. ou par la méthode de ZALTA et coll.) et quelle que soit la méthode d'extraction des RNA utilisée, on ne trouve pas de différence qualitative entre RNA nucléaires de foie de rats normaux ou hypophysectomisés.

Il semble donc que l'effet de l'hypophysectomie se traduise essentiellement par un ralentissement de la synthèse des RNA dans la cellule hépatique plutôt que par une modification sélective de la synthèse de certains RNA à renouvellement rapide.

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction de cette partie de notre travail, le marquage rapide ne représente qu'un critère, non absolu, des RNA messagers, puisqu'il peut également s'appliquer au RNA précurseur du RNA ribosomal. Nous avons par ailleurs montré l'extrême variabilité des caractéristiques de sédimentation que les RNA à marquage rapide nucléaire peuvent présenter, selon les conditions de préparation des noyaux et d'extraction des RNA. Une grande prudence s'impose donc dans l'interpré-

tation des résultats des expériences de marquage rapide des RNA en vue de leur transposition sur le plan des mécanismes d'action des hormones.

La stimulation de la synthèse protéique "in vitro" représente un critère plus spécifique des RNA messagers. C'est sur ce critère que nous nous baserons pour essayer de mettre en évidence des différences d'activité messagère au niveau du tissu hépatique des rats normaux ou hypophysectomisés.

B - SYNTHESE PROTEIQUE IN VITRO EN PRESENCE DES RNA MESSA-
GERS DES ANIMAUX NORMAUX ET HYPOPHYSECTOMISES

CHAPITRE VI

MISE AU POINT ET CARACTERISTIQUES DE
FONCTIONNEMENT D'UN SYSTEME DE SYNTHESE
PROTEIQUE ACELLULAIRE DE FOIE DE RAT

Comme nous venons de le voir dans la partie précédente de ce travail, il est actuellement établi que le critère le plus direct et le plus valable pour caractériser un RNA messenger réside dans sa capacité de stimulation de la synthèse protéique. Nous nous sommes donc proposés de mettre au point un système acellulaire de foie de rat qui nous permette de tester la capacité de stimulation de l'incorporation d'acides aminés marqués dans les protéines par les mRNA.

Au moment où nous avons commencé cette étude, les modalités pour la préparation d'un tel système étaient surtout décrites dans le cas des bactéries et le plus employé était le système acellulaire d'*E. coli*. Relativement peu de travaux concernant la stimulation de la synthèse protéique dans les systèmes acellulaires de mammifères étaient alors signalés. De plus, les résultats et les conclusions de ces travaux étaient souvent contradictoires.

Partant des données existantes, nous avons élaboré un système permettant d'obtenir d'une manière reproductible une incorporation élevée des acides aminés dans les protéines en présence du RNA messenger endogène et, après inactivation de ce dernier par préincubation, une forte stimulation de l'incorporation de la phénylalanine en présence de poly U (SCHMITT et coll., 1968). Par la suite, nous avons comparé la capacité de stimulation de la

synthèse protéique par des RNA nucléaires ou cytoplasmiques de foies de rats normaux ou hypophysectomisés.

1. Préparation des fractions subcellulaires entrant dans la composition des systèmes acellulaires

a) Principe

Il est connu que des coupes de tissu, incubées in vitro sont capables d'effectuer des synthèses protéiques spécifiques. Par contre, ces dernières sont pratiquement supprimées lorsqu'on s'adresse à des homogénats tissulaires bruts. Il est actuellement possible d'isoler et de purifier à partir d'un tel homogénat, les constituants fondamentaux de la synthèse protéique et de les rassembler par la suite dans des proportions et dans un milieu environnant équilibrés, de manière à réactiver la fonction de protéosynthèse. Les difficultés consistent surtout à retrouver les conditions idéales d'équilibre, c'est-à-dire les nombreux facteurs physicochimiques permettant le maximum d'activité du système.

Nous avons ainsi développé l'étude de plusieurs systèmes acellulaires de foie de rat en procédant par étapes successives de purification croissante. Nous appellerons ces systèmes "S-20", "Microsomal", "Polysomal" et "Ribosomal". Le schéma V permet de situer les différentes étapes de purification définissant ces quatre systèmes.

b) Modalités techniques

Les foies, après décapitation des rats, sont perfusés in situ avant le prélèvement avec 40 ml de NaCl 0,14 M et 20 ml de solution A' ayant la composition suivante :

<i>Tris-HCl</i> , pH 7,2	0,0025 M
<i>MgCl</i> ₂	0,005 M
<i>KCl</i>	0,025 M
<i>Saccharose</i>	0,25 M

Les solutions sont maintenues à 0°C et préparés fraîchement avec de l'eau distillée stérile avant chaque

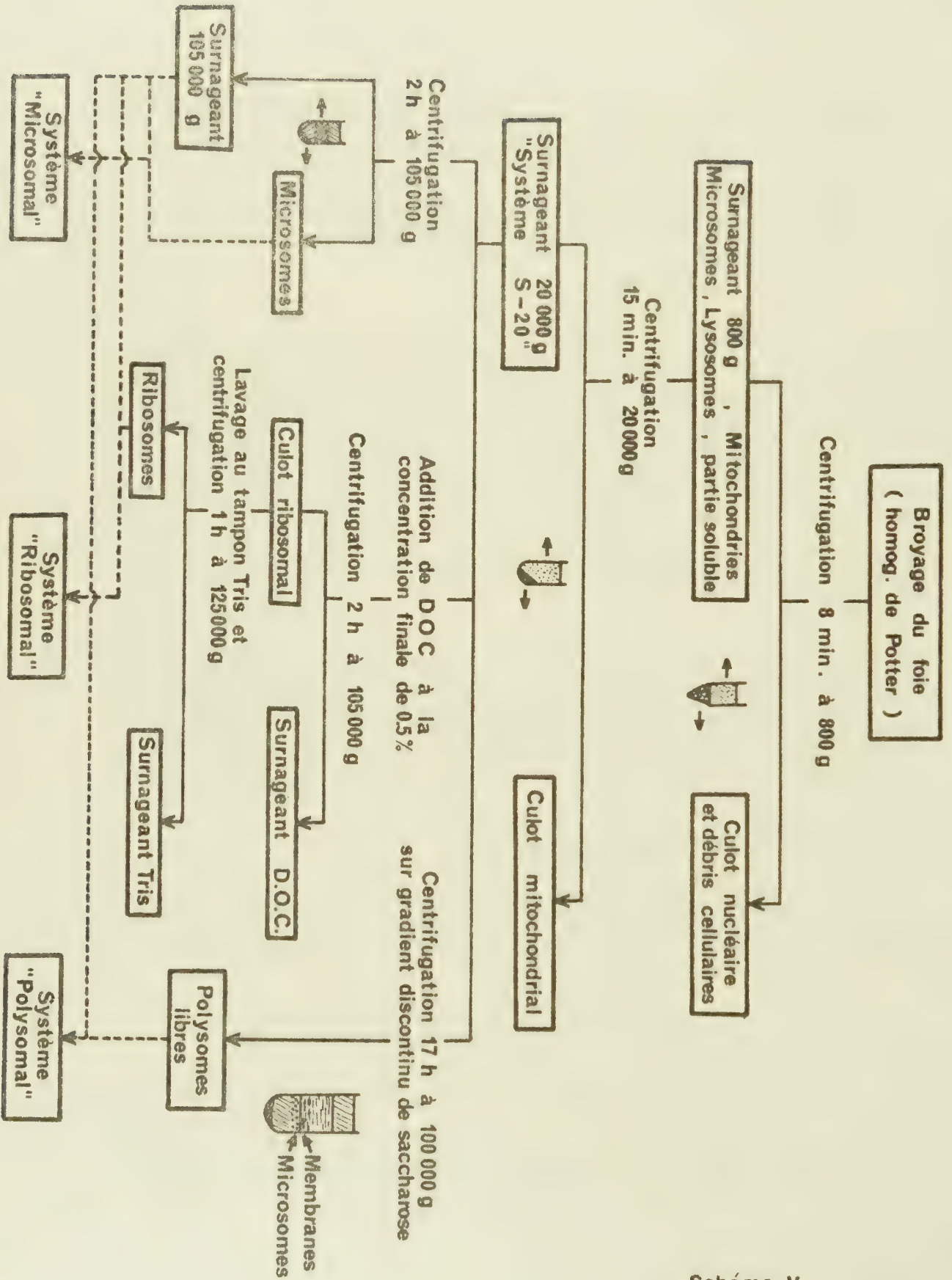


Schéma V.

expérience. Les opérations ultérieures sont effectuées en chambre froide (0° à 4°).

Chaque fois est rapidement découpé et les morceaux sont broyés dans 4 volumes de solution A' à l'aide d'un homogénéiseur de Potter-Elvehjem. On effectue 5 passages avec un piston en verre ayant un jeu de 1 mm et tournant à la vitesse de 500 t/min., puis 10 passages avec un piston en téflon ayant un jeu de 0,12 mm et tournant à 1000 t/min. Il est important d'éviter la rupture des noyaux tout en provoquant l'éclatement de la majorité des cellules. La suspension est ensuite filtrée à travers une triple épaisseur de gaze pour éliminer les fibres conjonctives et le collagène.

La suite consiste à effectuer des centrifugations différentielles pour séparer les particules de taille et de densité différentes. Nous avons été amené après divers essais et contrôles microscopiques à adopter les modalités suivantes pour le fractionnement : une première centrifugation est effectuée pendant 8 minutes à 800 g (centrifugeuse Jouan K 63 F, 1200 t/min.) pour éliminer les noyaux et les gros débris cellulaires. La fine couche lipidique superficielle est éliminée par aspiration avec une aiguille fine à la trompe à vide. Le surnageant est prélevé à la seringue et transvasé dans un tube en polycarbonate pour une deuxième centrifugation de 15 min. à 20.000 g* dans le rotor Spinco 30. Cette opération entraîne la sédimentation des mitochondries ; le surnageant constituant le système brut "S-20" est prélevé par aspiration à la seringue.

Pour obtenir les microsomes, une nouvelle centrifugation du surnageant postmitochondrial est effectuée dans le rotor Spinco 30 pendant 2 heures à 105.000 g. Le surnageant localisé dans la partie centrale du tube est utilisé comme fraction enzymatique. On peut également utiliser comme fraction enzymatique une préparation "pH5-enzyme" extraite à partir de ce surnageant 105.000 g selon la technique de KELLER et ZAMECNIK (1954). Le surnageant précédent est ramené progressivement et sous agitation constante à pH 5,1 avec de l'acide acétique 1 N. Le précipité formé est recueilli par une centrifugation de 10 min. à 6.000 g dans un tube conique. Le précipité est lavé avec la solution A' ajustée à pH 5,1 et recentrifugé. Finalement, le précipité est re-

* Le nombre de g correspond à l'accélération au fond des tubes.

pris avec le milieu A' et le pH est amené à 7,2 avec une solution de KOH à 1 p. 100. Le précipité se solubilise presque totalement ; on élimine les particules insolubles par une centrifugation de 15 min. à 6.000 g.

A partir des microsomes, il est possible de préparer des "ribosomes". En fait, ce terme recouvre une certaine hétérogénéité. Ces "ribosomes" sont en effet constitués d'une certaine proportion de polysomes de taille variable et de ribosomes libres au sens strict du terme. Deux manières permettent de les obtenir.

Dans le premier procédé, dérivé de la technique de KORNER (1961), le surnageant postmitochondrial est amené à la concentration de 0,5 p. 100 en ~~dé~~^{de} ~~s~~^{xy}cholate de sodium (DOC) et centrifugé pendant 2 heures à 105 000 g. Le surnageant est écarté et le culot ribosomal est lavé avec la solution B' dont la composition est la suivante :

<i>Tris-HCl</i> , pH 7,2	0,022 M
<i>MgCl</i> ₂	0,0075M
<i>KCl</i>	0,12 M
<i>NaCl</i>	0,075 M

Le culot est remis en suspension dans 1/2 volume de solution B' à l'aide d'un homogénéiseur de Potter et la suspension est centrifugée une dernière fois pendant 1 heure à 125 000 g dans le rotor Spinco 50.

Un deuxième procédé, décrit par BLOEMENDAL et coll. (1967) permet d'obtenir les polysomes libres, c'est-à-dire non fixés aux membranes des microsomes. Dans un tube contenant au fond 20 ml de solution de saccharose 2 M, puis une couche de 20 ml de solution de saccharose 1,5 M (de même composition ionique que le milieu A'), 10 ml de surnageant 20 000 g sont déposés avec précaution à la surface de cette couche. On procède à une centrifugation de 17 heures à 100 000 g (Rotor Spinco SW-25.2.) à 4°C. On peut ensuite prélever par ponction la fraction de "membranes lisses" au niveau de la couche 1,5 M de saccharose et la fraction "microsomale" au niveau supérieur de la couche 2 M de saccharose. Les polysomes libres se trouvent au fond du tube.

2. Description des différents systèmes utilisés

Nous étudierons les conditions d'utilisation des systèmes de synthèse protéique *in vitro* suivants :

- *système acellulaire brut "S-20"*
- *système microsomal*
- *système ribosomal et polysomal.*

Nous décrirons d'abord en détail le système microsomal pour lequel une étude de mise au point approfondie a été effectuée. Nous indiquerons par la suite les différences que présentent les autres systèmes par rapport à ce système de référence.

a) Système microsomal

Nous présenterons ici uniquement les modalités techniques auxquelles nous nous sommes arrêté après leur mise au point préalable. Les différents facteurs qui nous ont amené au choix de ces conditions optimales seront décrits plus loin.

(a) Microsomes.

Le culot microsomal provenant de 10 g de foie est rincé à trois reprises avec 5 ml de milieu B'. Puis il est prélevé avec une spatule et mis en suspension dans 2 ml de solution B' à l'aide d'un homogénéiseur de Potter (modèle Braun de 5 ml, à piston en téflon) par cinq passages de piston à 1.000 t/min. Cette suspension est ajustée à environ 333 µg de RNA par ml de la manière suivante : 10 µl de la suspension sont prélevés avec une micropipette à étranglement Pedersen et dilués dans 5 ml de milieu B' ; la densité optique (D.O.) est lue à 260 mµ au spectrophotomètre "Jobin Yvon ; un étalonnage établi au préalable permet d'extrapoler à partir de cette lecture les concentrations en RNA et en protéines de la suspension ; connaissant ainsi la concentration approximative en RNA de la suspension initiale, il est facile de calculer le facteur de dilution pour ramener la suspension à la concentration voulue de 333 µg de RNA par ml (figure 17).

Les courbes d'étalonnage reliant la D.O. des suspensions à la concentration en RNA ou en protéines ont été établies à partir d'une gamme de dilutions de plusieurs préparations microsomales. Les droites obtenues étant reproductibles d'une préparation à l'autre, il suffit donc d'établir une seule fois l'étalonnage qui est valable pour toutes les préparations microsomales effectuées dans les mêmes conditions techniques.

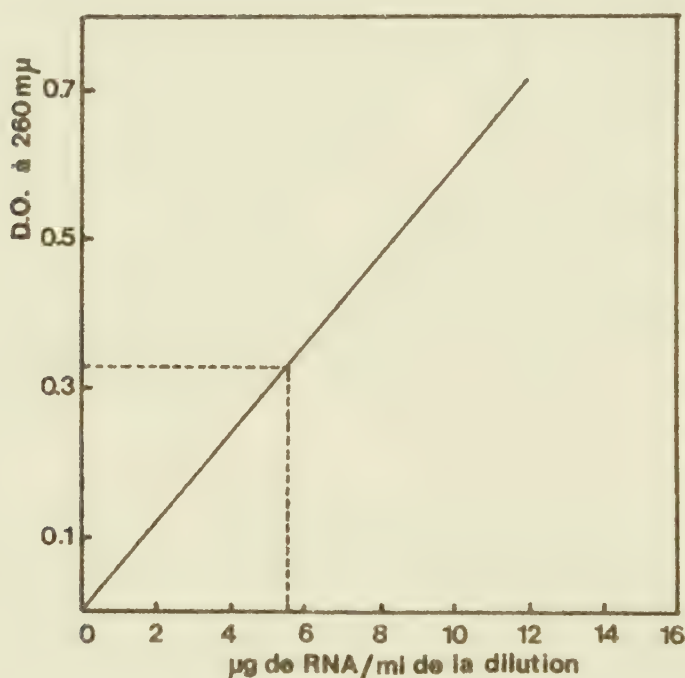


Fig. 17 - Courbe d'étalonnage pour l'ajustement des suspensions microsomales.

Exemple : D.O. 260 de la dilution au $1/500^{\circ} = 0,330$

Ceci correspond à $5,5 \mu\text{g}$ de RNA/ml de cette dilution.

Par ml de suspension initiale, il y a

$$5,5 \times 5 \times 100 = 2,75 \text{ mg de RNA}$$

Le facteur de dilution est donc de

$$2\,750/333 = 8,3$$

Il suffit de ramener 1 ml de la suspension initiale à 8,3 ml avec la solution B'.

Les concentrations exactes des suspensions de microsomes ont été mesurées par la méthode de LOWRY et coll. (1951) pour les protéines et par la méthode de MEJBAUM (1939) pour le RNA. Ces dosages ont montré que dans les diverses préparations de microsomes, le rapport RNA/protéines est relativement constant (tableau III), et se situe aux environs

T A B L E A U I I I

Taux de RNA et de Protéines dans les microsomes

Préparations microsomales	Protéines µg/0,3ml	RNA µg/0,3 ml	Pourcentage de RNA
no 1	940	98	9,5
2	840	106	11,2
3	870	111	11,3
4	900	110	10,8
5	1050	107	9,2
6	930	96	9,3
7	1020	114	10,6
8	930	104	10,4

de 0,1. Cette valeur est en accord avec les données de PETERMANN (1964) et de SCORNIK et coll. (1967). De leur côté, CAMPBELL et coll. (1964) et TATA et coll. (1963) ont trouvé un rapport RNA/Protéines un peu plus fort, de l'ordre de 0,15.

Les microsomes ainsi préparés présentent également des spectres d'absorption reproductibles (figure 18), avec un minimum d'absorption à 245 mµ et un maximum à 260 mµ. Le rapport des DO 245/260, qui est en moyenne de 0,90, donne en première approximation une idée assez nette du degré de pureté d'une préparation microsomale. Le rapport des DO 280/260 est lui aussi relativement constant, il est en moyenne égal à 0,68.

Le RNA microsomal obtenu par extraction phénolique selon la méthode de SPORN et DINGMAN et analysé dans un gradient de saccharose présente un profil constitué par les pics 28 S et 18 S du RNA ribosomal intact. On note cependant la présence d'une faible quantité de RNA 4 S correspondant vraisemblablement au tRNA qui reste fixé sur les microsomes (figure 19 a).

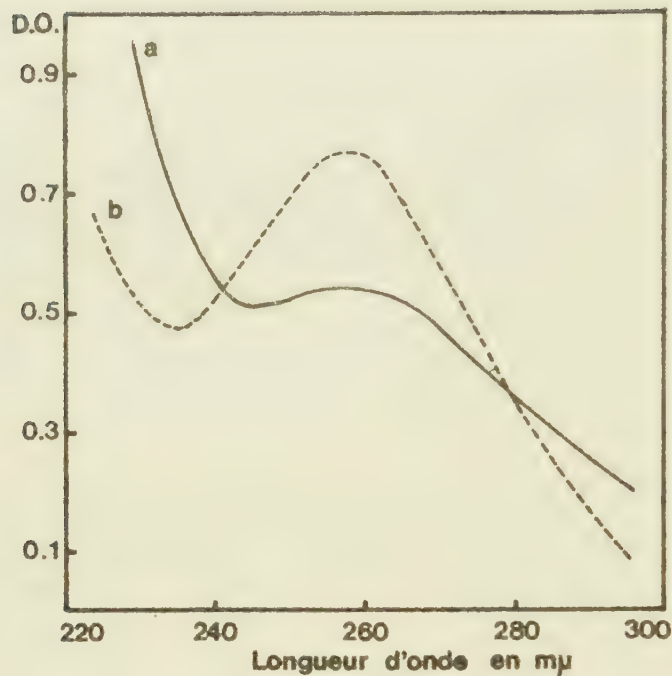


Fig. 18 - Spectre d'absorption dans l'ultra violet :
 a. - des microsomes en suspension dans la solution B' (———)
 b. - des ribosomes obtenus par le traitement au D0C en suspension dans la solution B' (-----).

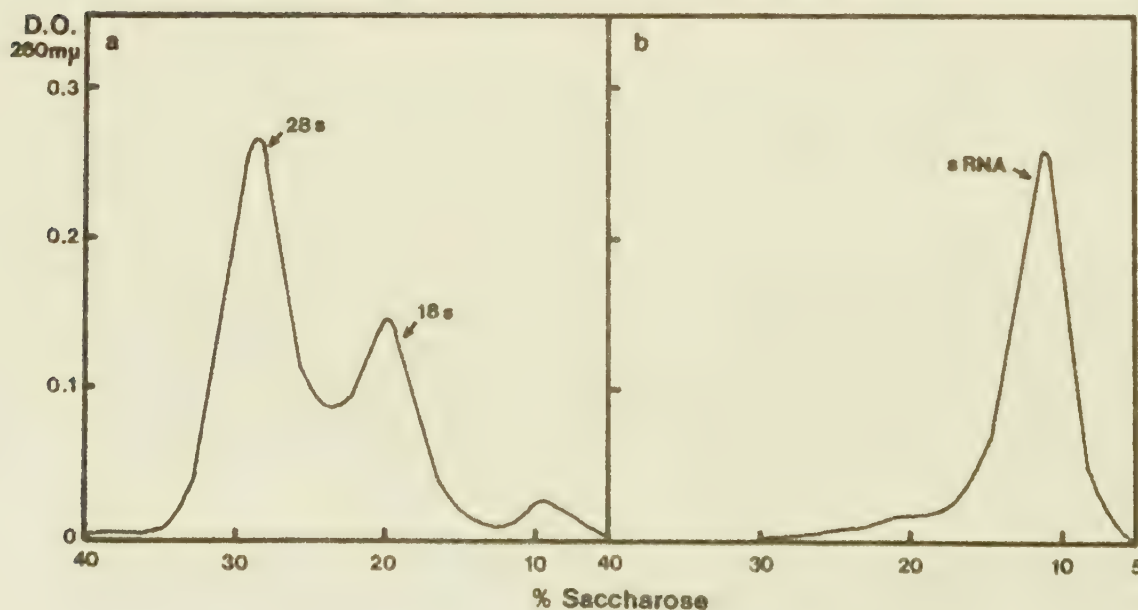


Fig. 19 - Profils en gradient de saccharose des RNA extraits par la technique de SPORN,

a. - à partir des culots de microsomes.
 b. - à partir du surnageant 105 000g.

L'examen au microscope électronique montre que les culots de microsomes sont relativement homogènes et essentiellement constitués de vésicules et de ribosomes comme on peut le voir sur la photo à fort grossissement de la Planche III.

(β) Fraction enzymatique.

Comme fraction enzymatique, on prélève, par aspiration avec une seringue, 4 ml de surnageant 105.000 g localisés dans la partie centrale du tube de centrifugation. Ceci permet d'éviter de contaminer cette fraction avec la fine couche lipidique se trouvant à la surface du tube.

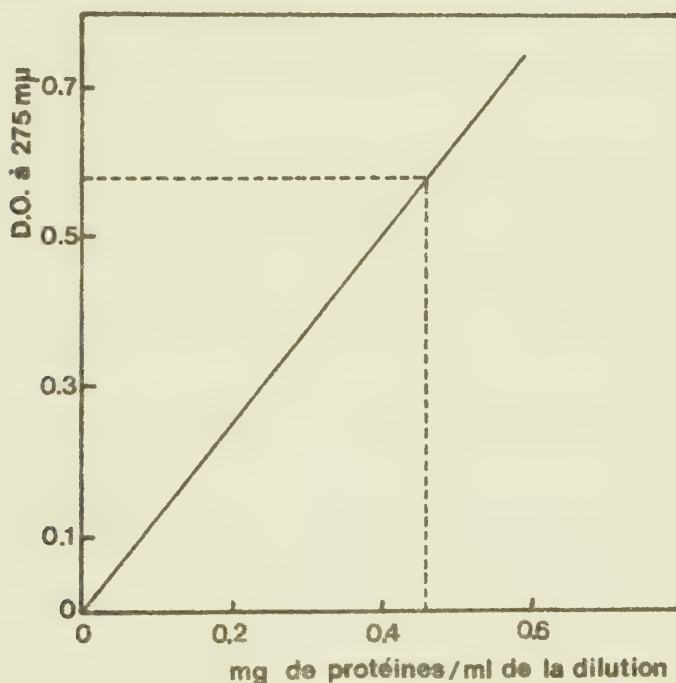


Fig. 20 - Courbe d'étalonnage pour l'ajustement du surnageant 105 000 g.

Exemple : D.O. 275 de la dilution au $1/30^e = 0,580$
Ceci correspond à 0,46 mg de protéines/ml de cette dilution.

Par ml de surnageant initial il y a

$$0,46 \times 3 \times 10 = 13,8 \text{ mg de protéines}$$

Le facteur de dilution est donc de $13,8/5 = 2,8$

Il suffit de ramener 1 ml du surnageant initial à 2,8 ml avec la solution A'.

Cette solution étant en général légèrement acide (pH 6,6 à 6,8), le pH est ramené à 7,0 (mesuré à 0°C) par une solution de KOH à 1 p. 100.

La solution est ensuite ajustée à une concentration d'environ 5 mg de protéines par ml, en procédant comme suit : on prélève à l'aide d'une micropipette Pedersen 100 μ l de surnageant initial que l'on dilue dans 3 ml de milieu A'. La D.O. est lue à 275 m μ au spectrophotomètre Jobin Yvon. Une courbe d'étalonnage établie selon le même principe que précédemment, permet de déduire la concentration en protéines du surnageant initial (figure 20).

L'analyse en gradient de saccharose du RNA extrait à partir de cette fraction montre que celui-ci est exclusivement constitué de RNA 4 S (figure 19 b).

(γ) Conditions d'incubation.

L'incorporation des amino-acides marqués au ^{14}C dans les protéines est testée dans le milieu réactionnel ayant la composition suivante :

- 0,3 ml de la suspension microsomale ajustée, soit 100 μ g de RNA
- 0,3 ml de surnageant 105.000g ajusté, soit 1,5 mg de protéines
- 0,2 ml d'un mélange générateur d'énergie, contenant en solution dans l'eau distillée
1 μ M d'ATP, 0,6 μ M de GTP
10 μ M de PEP et 30 μ g de Pyruvate kinase
- 0,1 ml de solution B' contenant ou non le mRNA
- 0,1 ml de solution B' contenant 1 μ Ci d'acide marqué au ^{14}C .

Ces constituants sont pipetés à l'aide de micropipettes Pedersen à étranglement et placés dans des tubes coniques de 8 ml en pyrex (adaptés à la centrifugeuse Jouan K 63 F), maintenus à 0°C dans un bain de glace. Un petit agitateur en verre est placé dans chaque tube et le mélange réactionnel contenu dans ces tubes à raison de 1 ml est incubé à 37°C dans un Bain Marie (modèle Buhler) sous agitation douce afin de bien homogénéiser le milieu. Les 30 min.

d'incubation étant écoulées, la réaction est arrêtée par immersion rapide des tubes dans le bain de glace. Après 5 min. les tubes sont placés dans un congélateur à -20°C . On peut ainsi conserver les tubes pendant plusieurs jours avant de procéder à l'extraction des protéines.

Le mélange générateur d'énergie est préparé de la manière suivante :

- 12 mg d'ATP sont dissous dans 1 ml d'eau distillée
- 7,2 mg de GTP sont dissous dans 1 ml d'eau distillée
- 40 mg de PEP sont dissous dans 1 ml d'eau distillée
- 60 μl d'une suspension de PK à 10 mg/ml sont dilués dans 1 ml de solution B'.

Les solutions d'ATP, de GTP et de PEP qui sont acides sont préalablement et séparément ajustées à pH 7,0 (mesuré à 0°C) par une solution de KOH à 1 p. 100 avant d'être complétées au volume final et mélangées. Pour la solution de PEP qui est très acide (à pH 2 env.), on neutralise d'abord avec une solution de KOH 1 M jusqu'à pH 6,5 environ.

Les aminoacides marqués au ^{14}C , étant généralement fournis en solution chlorhydrique N/100 à raison de 100 $\mu\text{Ci/ml}$, cette dernière est diluée par la solution B' de manière à obtenir une concentration de 10 $\mu\text{Ci/ml}$. Le pH est ajusté à 7,0. Cette solution peut être conservée pendant plusieurs mois, congelée à -20°C sous forme de fractions contenant la quantité nécessaire pour une expérience (afin d'éviter les décongélations successives).

(d) Conditions de préincubation.

La synthèse protéique dans ce système microsomal atteint généralement un niveau de saturation après 15 min. d'incubation par épuisement du RNA messenger endogène. Mais à ce moment la protéosynthèse peut être réactivée par addition dans le milieu d'un RNA messenger exogène et en respectant certaines conditions. On peut ainsi induire une synthèse nouvelle de protéines déterminées, correspondant aux codons de ce messenger exogène. On procède dans ce cas à une préincubation dans les conditions suivantes :

On effectue le mélange de :

- 0,3 ml de la suspension microsomale
- 0,3 ml de la fraction enzymatique
- 0,1 ml du mélange générateur d'énergie (ATP, GTP, PEP, PK), par tube.

On déclenche la réaction en portant les tubes à 37°C dans le Bain-Marie et, après 15 min. d'incubation, les tubes sont rapidement refroidis à 0° dans un bain de glace fondante. Cette préincubation est suivie d'une nouvelle incubation de 30 min. après addition au mélange de :

- 0,1 ml du mélange générateur d'énergie
- 0,1 ml de solution B' contenant ou non un RNA messenger exogène
- 0,1 ml de solution B' contenant 1 µCi d'acide radioactif.

La réaction est arrêtée de la même manière que lors de l'incubation directe.

(c) Mesure de la radioactivité incorporée dans les protéines.

Après le séjour des tubes au congélateur à - 20°C (2 heures à 3 jours ; dans ce laps de temps la radioactivité acido-précipitable ne subit aucune variation), les tubes sont décongelés dans l'eau courante. Dès la fin de la décongelation, la suspension est bien mélangée dans les tubes à l'aide de l'agitateur en verre et les protéines sont immédiatement précipitées par addition, dans chaque tube, de 5 ml de TCA à 10 p. 100. Les tubes sont portés pendant 3 min. dans un Bain-Marie à 90°C. Le précipité est sédimenté par une centrifugation de 10 min. à 3.000 g dans la centrifugeuse Jouan K 63 F. Le surnageant est aspiré et écarté. Le précipité est remis en suspension et lavé successivement par 5 ml de TCA 5 p. 100 à température ambiante, puis par 5 ml de TCA 10 p. 100 pendant 20 min. à 90°C. Ce dernier traitement a pour effet d'hydrolyser les acides nucléiques en fragments acido-solubles et permet ainsi de débarrasser le précipité du ¹⁴C aminoacyl-tRNA, tandis que les protéines restent insolubles. Les lipides sont extraits à deux reprises par 5 ml d'éthanol pur à 60°C pendant 5 min. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation de 10 min. à 3.000 g. Après la dernière centrifugation les traces d'éthanol

sont éliminées par séchage partiel dans un dessiccateur sous vide en évitant la dessiccation totale du précipité. Puis on dissout le précipité dans 1 ml d'acide formique à 50 p. 100. On prélève à la pipette 0,8 ml de cette solution qu'on dépose sur une lamelle cuivre objet (de 22 mm de diamètre) et on laisse sécher. La radioactivité est finalement mesurée dans un compteur Beckman Lowbeta II.

Les résultats sont généralement exprimés en C P M pour 100 µg de RNA microsomal, chaque résultat représentant la radioactivité moyenne de 3 échantillons du même type. Chaque série expérimentale comporte, entre autre, des tubes témoins ou "blancs" contenant le même milieu réactionnel et qui sont maintenus à 0°C pendant le temps correspondant à la durée d'incubation. La radioactivité de ces "blancs" rend compte des contaminations dues à l'élimination imparfaite de l'acide aminé marqueur au cours des lavages. La valeur des blancs varie en fonction de l'acide aminé employé et de son activité spécifique. On compare à ces témoins les tubes incubés portés à 37°C pendant un temps défini. La radioactivité de ces tubes, diminuée de celle des blancs, correspond à l'incorporation de l'acide aminé marqué dans les protéines, due à la présence des RNA messagers dans le système acellulaire. Elle traduit "l'activité propre" du mRNA endogène dans le système étudié.

A cette "activité propre", on peut comparer l'activité des échantillons incubés, auxquels on a ajouté un RNA messager exogène, le poly U, du RNA nucléaire, etc.

Après avoir effectué une préincubation, on compare la radioactivité des échantillons incubés en présence d'acide aminé marqué et de RNA messager exogène à celle des échantillons incubés sans addition de ce mRNA ; ces derniers traduisent "l'activité résiduelle", c.à.d. la faible activité développée par le système après préincubation.

Pour évaluer l'ampleur des stimulations on peut, soit déterminer le rapport entre l'activité obtenue en présence de mRNA exogène et l'activité en absence de ce mRNA (appelé "facteur de stimulation"), soit calculer la différence entre les valeurs absolues des deux activités.

(ζ) Dosage des protéines et des RNA des suspensions.

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de LOWRY (1951) sur des aliquotes de 0,1 ml de la suspension microsomale et de 0,1 ml du surnageant 105.000 g préalablement ajustés comme indiqué au paragraphe 2 a.

En ce qui concerne les RNA, la méthode utilisée est une adaptation des techniques de SCHNEIDER (1945) et de MOULE (1953). A des aliquotes de 0,3 ml de la suspension microsomale ajustée, on ajoute 2 ml de TCA 10 p. 100 froid et on laisse le précipité se former pendant 15 minutes à 4°C. Le précipité est sédimenté par une centrifugation de 10 min. à 3.000 g, puis lavé à froid à deux reprises avec 2 ml de TCA à 5 p. 100. Les surnageants sont aspirés et écartés. Le précipité est alors hydrolysé à 70°C pendant 15 min. par 2 ml d'acide perchlorique 1 M. Le matériel insoluble est écarté par centrifugation et le surnageant est recueilli quantitativement à l'aide d'une pipette Pasteur. Le précipité est soumis à une deuxième hydrolyse perchlorique dans les mêmes conditions, puis à un lavage avec 1 ml d'acide perchlorique 1 M, à froid. Les surnageants sont réunis et ramenés à un volume final de 5 ml. Le dosage du ribose est effectué par la technique de MEJBAUM (1939) à partir de 2 ml de l'hydrolysate obtenu précédemment. On utilise comme substance de référence un RNA cytoplasmique de foie de rat.

b) Système acellulaire brut "S-20"

Pour ce système les conditions générales de préparation et d'incubation sont celles décrites plus haut pour le système microsomal, exception faite pour les points énumérés ci-après.

Le fractionnement est arrêté au stade de la première centrifugation à 20.000 g (voir schéma V), c.à.d. on utilise directement le surnageant postmitochondrial brut. L'incubation et la préincubation sont effectuées avec 0,6 ml de cette suspension préalablement ajustée à environ 170 µg de RNA par ml. Pour cela, on détermine l'absorption à 260 mµ d'une dilution de 0,1 ml de la suspension dans 3 ml de solution A'. Puis on calcule le facteur de dilution pour ramener la suspension initiale à une D.O. de 0,400 mesurée à 260 mµ. Cette dilution est effectuée de la manière suivante :

si le facteur de dilution est de 3 par exemple, on mélange 1 ml de surnageant 20.000 g avec 0,5 ml de solution A' et 1,5 ml de solution B' afin de conserver les proportions respectives des milieux A' et B'.

La proportion de RNA dans les suspensions "S-20" ainsi ajustées est en moyenne de l'ordre de 3 p. 100 par rapport aux protéines (tableau IV).

T A B L E A U I V

Taux de RNA et de protéines dans les suspensions "S-20"

Préparation "S-20"	Protéines (mg dans 0,6 ml)	RNA (mg dans 0,6 ml)	Pourcentage de RNA
1	3,180	0,105	3,2
2	3,720	0,110	3,0
3	3,350	0,106	3,1
4	3,570	0,096	2,6

c) Systèmes "Ribosomal" et "Polysomal"

Pour la préparation de ces systèmes, il est nécessaire de se débarrasser du complexe membranaire des microsomes. En effet, dans une préparation microsomale, les ribosomes ou polysomes sont en majeure partie intimement associés aux membranes du réticulum endoplasmique. Deux procédés permettent d'obtenir les particules ribonucléoprotéiques sous forme libre ou sous forme de polysomes. Le premier procédé préconisé par KORNER (1961) consiste à solubiliser les membranes par l'emploi du désoxycholate de sodium à une concentration déterminée qui permet de respecter la structure des ribosomes et des polysomes. Le deuxième procédé mis au point par BLOEMENDAL et coll. (1967), consiste à séparer les

polysomes préexistant à l'état libre dans le surnageant 20.000 g par une centrifugation différentielle dans un gradient de concentration de saccharose discontinu.

(α) Méthode de préparation des ribosomes par déprotéinisation au désoxycholate.

On prépare une solution à 5 p. 100 de désoxycholate de sodium dans la solution A'. On ajoute 1 ml de cette solution à 9 ml de surnageant 20.000 g postmitochondrial. La suspension est homogénéisée au Potter par 3 passages du piston, puis centrifugée à 105.000 g comme indiqué dans le schéma V. Les lavages du culot ribosomal avec la solution B' sont nécessaires pour éliminer les traces de DOC et obtenir des ribosomes actifs.

Finalement, le culot ribosomal est remis en suspension à l'aide d'un homogénéiseur de Potter (modèle Braun de 5 ml) et la solution est ajustée à environ 333 µg de RNA par ml en utilisant une courbe d'étalonnage établie selon le même principe que celui décrit pour les microsomes.

La composition en RNA et en protéines des particules ainsi isolées est en moyenne de 40 p. 100 de RNA et de 60 p. 100 de protéines.

Le spectre d'absorption est différent par rapport à celui des microsomes (fig. 18) ; il présente un minimum à 235 mµ et permet de juger du degré de purification de ces particules, notamment en faisant le rapport des D.O. 235/260 mµ qui est en moyenne de 0,63.

La centrifugation en gradient de saccharose dans les conditions indiquées dans la figure 21, montre qu'il s'agit d'un mélange de polysomes de différentes tailles et de monosomes.

(β) Méthode d'isolement des polysomes libres.

Le surnageant 20.000 g est centrifugé pendant 17 heures à 100.000 g à travers 2 couches de saccharose 1,5 M et 2 M selon les indications données dans le schéma V. Il faut signaler que cette technique est longue et que la

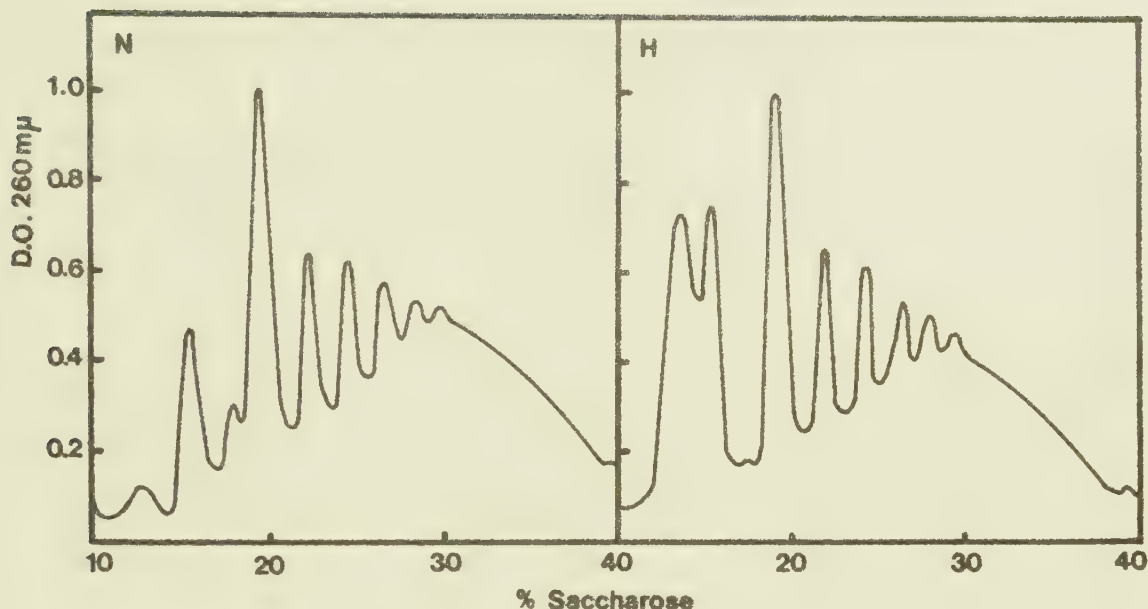


Fig. 21 - Profils de sédimentation des polysomes de foie de rats normaux (N) et de rats hypophysectomisés (H), obtenus par le traitement du surnageant 20 000g au DOC à 0,5% . (Centrifugation pendant 2 h 15 à 25 000 t/min., rotor Spinco SW-25.1, dans un gradient linéaire de concentration de saccharose de 10 à 40 % dans la solution tampon A' à pH 7,2).

quantité de polysomes ainsi obtenus est extrêmement faible.

3. Etude critique des facteurs influençant le fonctionnement du système microsomal

Nous décrivons ici l'étude critique des divers facteurs qui nous ont permis de déterminer les conditions optimales de fonctionnement du système microsomal, telles que nous les avons définies ci-dessus, aussi bien en ce qui concerne la stimulation de la synthèse protéique par le RNA messenger endogène ("activité propre") que celle des RNA messagers exogènes.

a) Influence de la concentration en microsomes sur l'activité propre

L'incorporation des aminoacides marqués dans les protéines, en fonction de la quantité de microsomes présents dans le milieu réactionnel, la quantité de surnageant 105.000 g étant constante, se traduit par une courbe de forme exponentielle.

La figure 22 montre que l'on peut assimiler la première partie de la courbe, jusqu'à une certaine concentration de RNA microsomal, à une droite. Dans cette zone, l'incorporation est proportionnelle à la quantité de microsomes. Au-dessus de cette concentration en RNA microsomal, la courbe s'infléchit, l'incorporation des aminoacides tendant vers une limite. Le facteur limitant est le surnageant 105.000 g, comme nous le verrons au paragraphe suivant.

On peut conclure de cette étude que dans des limites de concentrations de RNA microsomal très larges, l'incorporation est directement proportionnelle à la quantité de microsomes.

b) Influence de la concentration en surnageant 105.000 g sur l'activité propre

L'incorporation étudiée en fonction de la quantité de surnageant 105.000 g (ou préparation enzymatique), exprimée en mg de protéines, se traduit par une courbe de forme plus complexe que celle correspondant aux microsomes.

La figure 23 montre cette incorporation des aminoacides en fonction du surnageant 105.000 g, la quantité de RNA microsomal étant constante.

On constate tout d'abord que les microsomes présentent une faible activité d'incorporation en absence de préparation enzymatique. Ceci permet de penser qu'une faible proportion des enzymes nécessaires à la fixation et au transfert ainsi que du tRNA sont associés aux microsomes, probablement sous forme liée aux membranes. Ensuite, pour des quantités croissantes en protéines enzymatiques, l'incorporation augmente jusqu'à une valeur maximale. Pour des concentrations supérieures, l'incorporation diminue progressivement.

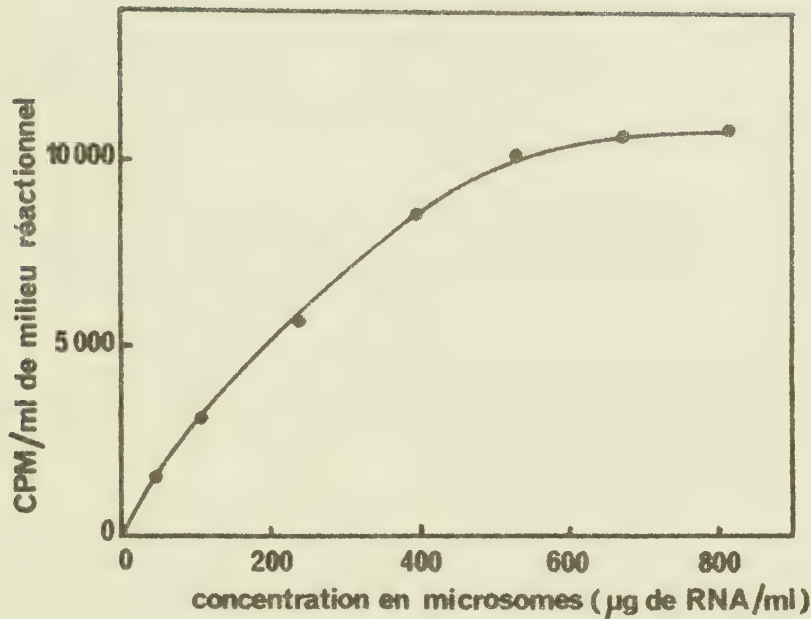


Fig. 22 - Incorporation des aminoacides (1 μ Ci/ml d'un mélange de dix 14 C-aminoacides) dans les protéines en fonction de concentrations croissantes de microsomes.

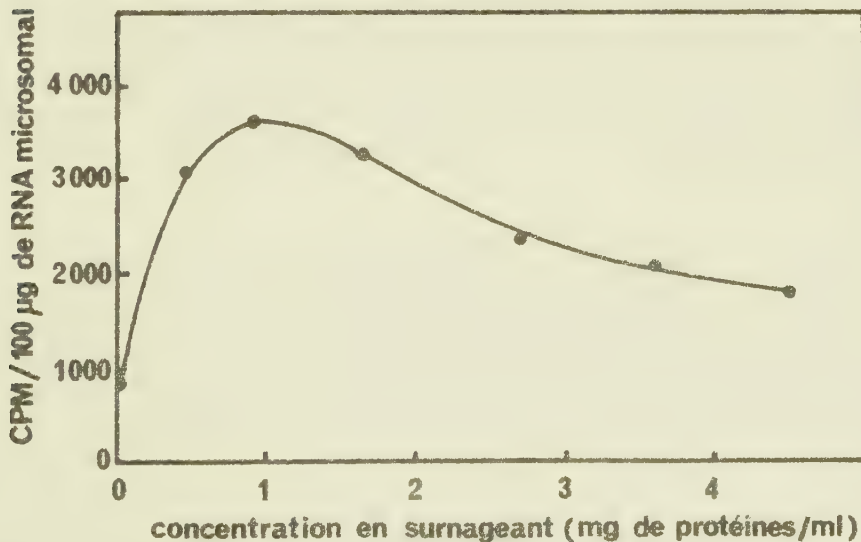


Fig. 23 - Incorporation des aminoacides (1 μ Ci/ml d'un mélange de dix 14 C-aminoacides) dans les protéines en fonction de concentrations croissantes de surnageant 105 000g.

On peut donc délimiter une zone pour laquelle l'incorporation est optimale. Deux interprétations peuvent être avancées pour expliquer la diminution de l'activité d'incorporation en présence d'un excès de surnageant 105.000 g :

- la préparation enzymatique contient des substances inhibitrices et il faut que soit réalisé un certain équilibre entre les proportions de microsomes et de surnageant 105.000 g pour que la synthèse soit optimale.
- la diminution lente de l'incorporation traduit tout simplement la dilution de plus en plus forte des aminoacides radioactifs par les aminoacides libres "froids" contenus dans le surnageant 105.000 g.

On voit d'après la figure 23 que, pour une concentration de protéines du surnageant inférieure à 0,5 mg pour 100 µg de RNA microsomal, la fraction enzymatique devient nettement limitative. Ceci explique l'infléchissement de la courbe des microsomes observée dans la figure 22 précédente, où ce taux inférieur de 0,5 mg de protéines du surnageant est atteint pour 325 µg de RNA microsomal.

En fonction de ces données, vérifiées par plusieurs essais, nous avons défini les proportions relatives entre microsomes et surnageant 105.000 g adoptées définitivement dans nos expériences ; soit pour 100 µg de RNA microsomal, 1,5 mg de protéines de surnageant 105.000 g, par ml de milieu réactionnel.

Comme préparation enzymatique, nous avons choisi la portion centrale du surnageant 105.000 g dans les tubes de centrifugation. En effet, on observe une variation de l'incorporation des aminoacides en fonction des différents niveaux du surnageant prélevé dans les tubes après centrifugation, les fractions centrales étant plus actives à concentration en protéines égales (figure 24).

c) Cinétique de l'incorporation des aminoacides dans les protéines due au RNA messager endogène

L'incorporation des aminoacides dans les protéines en fonction du temps d'incubation est relativement rapide et après 15 min. 90 à 95 p. 100 de l'incorporation maximale

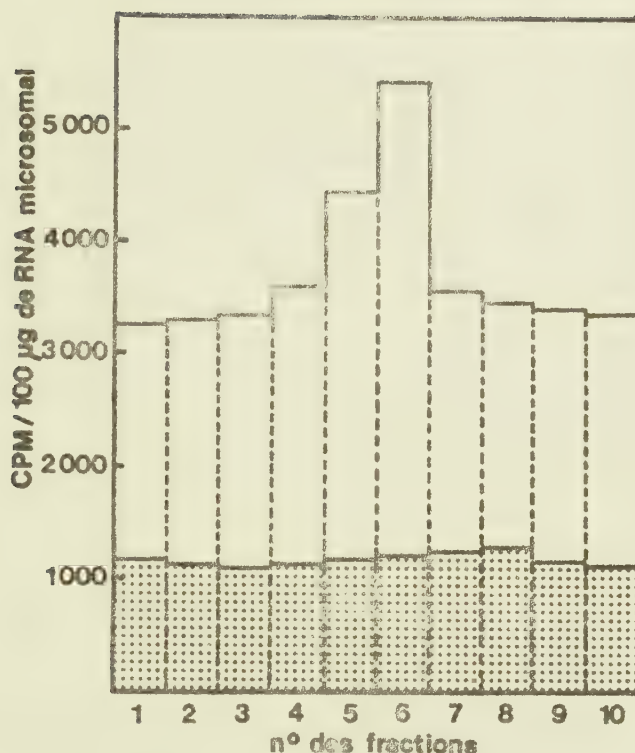


Fig. 24 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine en fonction des différentes fractions du surnageant 105 000g, en absence () et en présence de polyU ().
n° 1 = fraction inférieure du tube de centrifugation.
n° 10 = fraction supérieure du tube de centrifugation.

sont atteints. Après 30 min. d'incubation, l'incorporation n'augmente plus en général et reste à un niveau stable jusqu'à 2 heures au moins (figure 25). Cependant, dans certains cas, nous avons observé une augmentation de l'incorporation jusqu'à un temps d'incubation de 45 min. ; ces variations observées selon les préparations microsomales semblent être en relation avec la durée de conservation des microsomes avant l'incubation. Cela rejoint le cas des "ribosomes" préparés par un traitement au DOC, qui présentent des vitesses d'incorporation plus faibles que les microsomes, le maximum n'étant généralement atteint qu'au bout de 60 min. d'incubation.

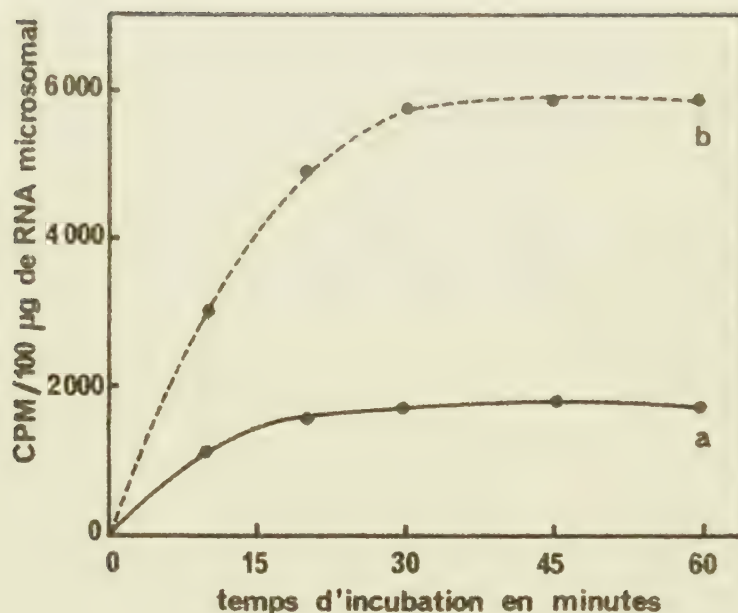


Fig. 25 - Cinétique de l'incorporation de ^{14}C -phénylalanine
a. - en absence de polyU (activité propre)
b. - en présence de 250 µg de polyU (stimulation additionnelle)

La vitesse de synthèse protéique dans le système microsomal est donc relativement élevée. Le fait qu'elle est plus lente avec des ribosomes suggère que la présence des membranes dans le système microsomal puisse avoir une signification quant à la vitesse de synthèse protéique.

d) Rôle de l'incubation et de la préincubation :
comparaison de l'activité propre et de la stimulation par le poly U

Lorsque les microsomes sont incubés en l'absence de RNA messenger exogène dans un milieu réactionnel convenablement ajusté et en présence d'une quantité équilibrée de surnageant 105.000 g apportant les enzymes nécessaires au transfert des aminoacides dans les protéines, on peut évaluer indirectement la quantité de protéines néoformées in vitro, en ajoutant au milieu un aminoacide radioactif servant de marqueur. En isolant et en purifiant le matériel protéique précipitable au TCA

pour le débarrasser de l'acide aminé radioactif libre n'ayant pas été intégré dans une structure polypeptidique, on peut mesurer la quantité de ce marqueur incorporée en l'exprimant en CPM ou en μ moles pour 100 μ g de RNA microsomal. Cette mesure reflète l'activité des RNA messagers endogènes engagés dans les structures polysomiques préexistantes. Si l'addition de RNA messenger exogène provoque une incorporation d'acides aminés supplémentaire, cela peut s'interpréter par la fixation de ces RNA messagers aux ribosomes libres, non liés entre eux en polysomes par le mRNA endogène. Donc plus une préparation sera pauvre en messenger endogène, plus elle pourra être stimulée par des RNA messagers exogènes ajoutés au milieu réactionnel.

Or, nous avons vu dans le paragraphe précédent (3 c) qu'après 15 min. d'incubation, l'activité propre du système, c.à.d. l'incorporation due au seul RNA messenger endogène, est réalisée à 95 p. 100, et on peut formuler l'hypothèse que dans ce laps de temps le mRNA endogène a été épuisé et inactivé. Les ribosomes ainsi libérés pourraient alors réagir avec un nouveau mRNA ajouté, par exemple un RNA messenger synthétique comme le poly U'.

Cet épuisement du RNA messenger endogène, conduisant à un abaissement de l'activité propre des microsomes, est réalisé par une "préincubation". Ce processus consiste à incuber les microsomes à 37°C pendant 15 min., en présence de surnageant 105.000 g, d'ATP, de GTP et de système générateur d'énergie, dans les conditions décrites au paragraphe 2 a. La préincubation est effectuée en absence de l'acide aminé radioactif. L'activité résiduelle des microsomes est testée en effectuant une nouvelle incubation de 30 min. en présence de l'acide aminé marqué. Cette activité résiduelle est comparée à l'incorporation obtenue après addition du RNA messenger exogène.

Pour l'étude de l'activité des microsomes, nous avons utilisé comme acide aminé marqueur, la 14 C-phénylalanine. Nous avons choisi cet acide aminé car il nous permet de tester la stimulation de la synthèse de polypeptides, non seulement sous l'influence du RNA messenger endogène, mais également en présence de poly U, polynucléotide de synthèse codant pour la phénylalanine.

(α) Activité propre des microsomes.

Les résultats de l'incorporation de la ^{14}C -phénylalanine sous l'influence du mRNA endogène sont indiqués dans le tableau V.

T A B L E A U V

Incorporation de la ^{14}C -phénylalanine dans les protéines en absence (activité propre) et en présence (activité additionnelle) de poly U

Expérience n°	Activité propre CPM/100 µg de RNA	Addition de poly U CPM/100 µg de RNA	Facteur de stimulation
1	1270	6882	4,0
2	1516	5983	3,9
3	1423	5038	3,7
4	1206	4810	4,5
5	1155	3758	3,2
6	1186	4635	3,6
7	1628	5508	3,4
8	1475	4739	3,2

On voit que cet aminoacide entre à un taux appréciable dans la constitution des protéines néoformées, et cela d'une manière reproductible. L'incorporation est, dans certaines limites, proportionnelle à la quantité de RNA microsomal présente dans le milieu d'incubation (figure 26).

(β) Activité additionnelle du système non préincubé, en présence de poly U.

L'addition de poly U permet une incorporation additionnelle de phénylalanine (Tableau V). Cette stimulation de l'incorporation par le poly U dans le système non préincubé est relativement constante en fonction de la concentration en

microsomes (figure 26). Elle est également reproductible et le facteur de stimulation se situe en général aux environs de 3,5. Ce résultat semble indiquer que dans les préparations de microsomes, la proportion de ribosomes libres est assez constante par rapport aux polysomes naturels liés par le mRNA endogène. Mais il n'exclut pas la possibilité qu'au fur et à mesure de la traduction du mRNA endogène, le poly U vienne se fixer à son tour sur les ribosomes devenus libres pour induire une nouvelle synthèse de polyphénylalanine

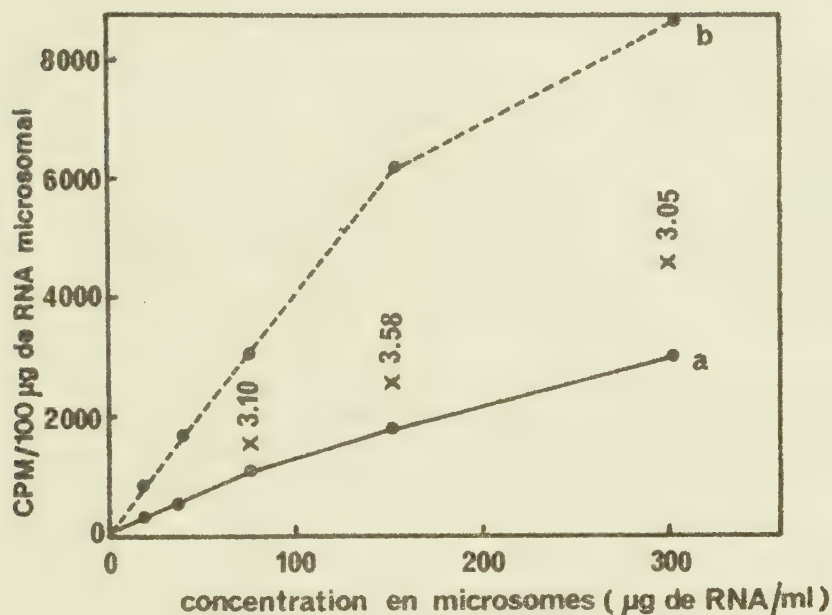


Fig. 26 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine (1 $\mu\text{Ci/ml}$) en fonction de la concentration en microsomes :
a. - en absence de polyU (activité propre)
b. - en présence de polyU (stimulation addittionnelle)

(γ) Activité du système préincubé en présence de poly U.

Le tableau VI montre qu'après préincubation et une nouvelle incubation en présence de ^{14}C -phénylalanine, cet aminoacide n'est pratiquement plus incorporé. Le système ne présente donc plus qu'une très faible activité propre résiduelle.

Des expériences préliminaires ont montré qu'après préincubation et addition de poly U, la phénylalanine n'est incorporée d'une manière optimale qu'à la condition d'ajouter au milieu réactionnel une nouvelle quantité du mélange générateur d'énergie (ATP-GTP et PEP-PK). Cet apport ne doit cependant pas dépasser une certaine limite. Une quantité trop importante inhibe, en effet, la stimulation par le poly U. Le tableau VI montre que si cette condition est respectée, le poly U stimule fortement et d'une manière reproductible l'incorporation de ^{14}C -phénylalanine.

T A B L E A U VI

Stimulation par le poly U de l'incorporation
de ^{14}C -phénylalanine après préincubation des
microsomes

Expérience n°	Activité résiduelle CPM/100µg de RNA	Addition de poly U CPM/100µg de RNA	Phénylalanine incorporée µM/100µg de RNA	Facteur de stimulation
1	73	4925	148	67
2	85	5211	156	61
3	72	4428	133	62
4	102	4032	121	39
5	73	4925	148	67
6	113	5078	152	44
7	82	4115	123	49
8	60	4727	142	79

Le facteur de stimulation est en moyenne de 60. La figure 27 montre que l'incorporation due au poly U est également proportionnelle à la quantité de microsomes (exprimée en RNA microsomal).

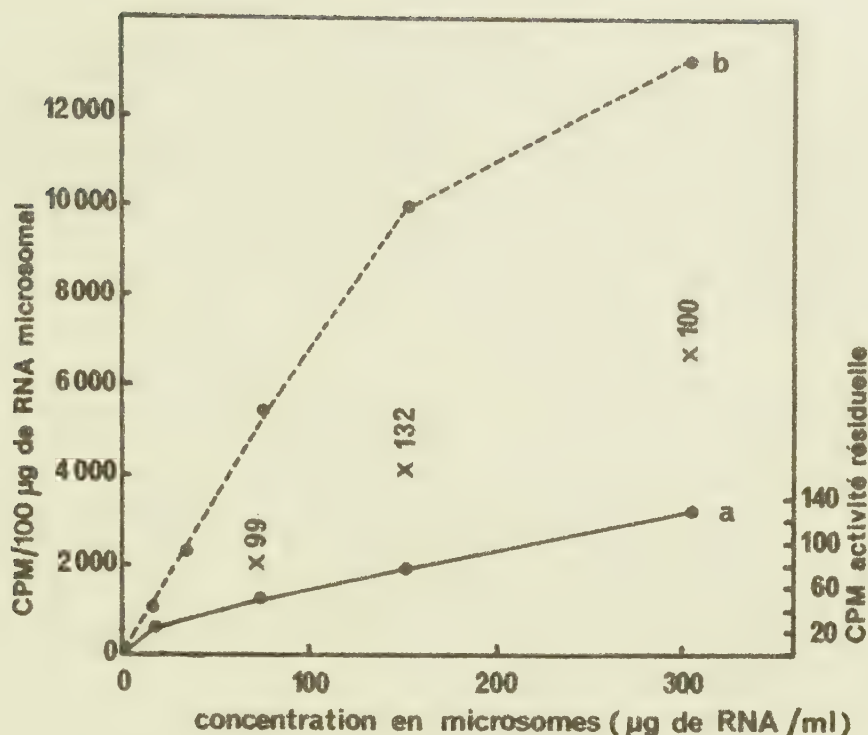


Fig. 27 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine en fonction de la concentration en microsomes après préincubation du système pendant 15 min.

- a. - en absence de polyU (activité résiduelle
(échelle de radioactivité à droite))
b. - en présence de polyU (stimulation exogène)

La forte stimulation par le poly U, mRNA exogène, de l'incorporation de la phénylalanine dans les polypeptides, montre que la chute d'activité après préincubation ne reflète ni le manque d'énergie, ni l'incapacité fonctionnelle des microsomes, mais l'épuisement du RNA messager endogène. En valeur absolue, l'incorporation due au poly U est plus forte dans le système préincubé qu'en incubation directe. Ceci également est en faveur de l'interprétation selon laquelle les ribosomes libérés après traduction du RNA messager endogène peuvent à nouveau entrer en combinaison fonctionnelle avec le poly U rajouté au milieu réactionnel.

Un autre type d'expériences confirme cette interprétation. Elle consiste à faire des préincubations de durée croissante entre 0 et 15 minutes et de mesurer simultanément

l'activité propre résiduelle et la stimulation par le poly U (figure 28). On constate que l'activité propre résiduelle diminue progressivement en fonction du temps de préincubation. Parallèlement, la stimulation par le poly U augmente jusqu'à une durée de préincubation de 10 min. environ. Pour un temps de préincubation supérieur à 10 min., la stimulation décroît lentement, ceci indique qu'à partir de ce moment d'autres mécanismes entrent en jeu.

L'étude de l'influence de concentrations croissantes en protéines du surnageant 105.000 g sur la stimulation par le poly U dans le système préincubé, nous a montré qu'un optimum de stimulation est obtenu pour une quantité de surnageant enzymatique correspondant à 1,5 mg de protéines pour 100 µg de RNA microsomal (figure 29). La courbe est semblable à celle obtenue pour l'incorporation due au mRNA endogène, en fonction de la concentration en protéines de la préparation enzymatique (paragraphe 3 b).

Donc en fixant le rapport RNA microsomal sur protéines enzymatiques à 1/15, on se trouve à la fois dans les conditions optimales pour l'étude de l'activité endogène et pour celle de la stimulation par le poly U.

En ce qui concerne l'influence du temps d'incubation, nous avons constaté qu'en présence de poly U, le maximum d'incorporation était également atteint après 30 min. d'incubation. Donc la synthèse protéique induite par le poly U est arrêtée après les mêmes délais que celle induite par le mRNA endogène (figure 25).

e) Influence du pH du milieu d'incubation

L'étude de la variation de l'incorporation de ^{14}C -phénylalanine en fonction du pH du milieu d'incubation, montre que ce dernier représente un facteur important. Généralement, les milieux réactionnels des systèmes acellulaires décrits dans la littérature sont tamponnés à pH 7,4 - 7,6. Nous avons constaté dans le cas présent, que le pH optimum du milieu d'incubation du système microsomal se place aux environs de pH 7,0 (mesuré à 0°C). De part et d'autre de ce pH, l'incorporation diminue rapidement et n'atteint pas 50 p. 100

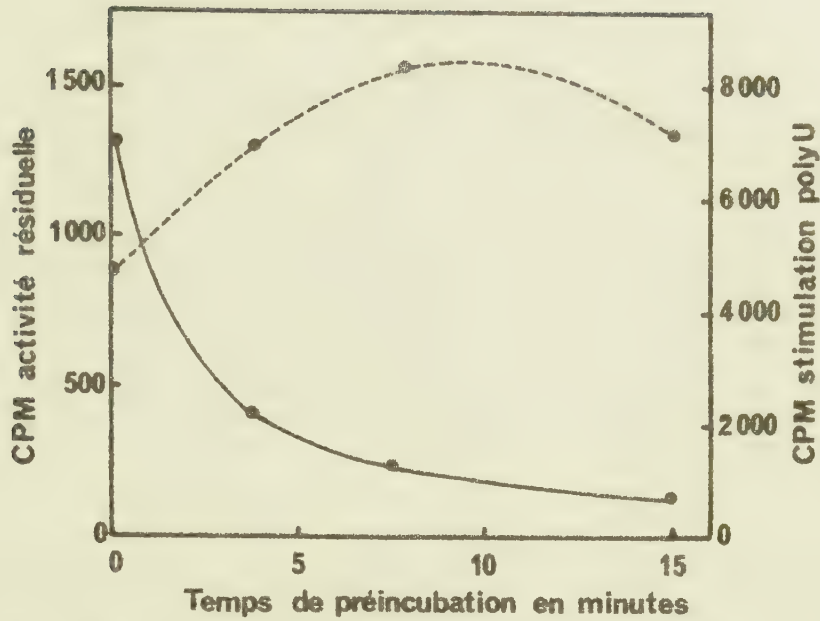


Fig. 28 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine dans les protéines. Activité résiduelle (•—•) et stimulation par le polyU (•-----•) en fonction du temps de préincubation. (exprimée en CPM pour 100 μg de RNA microsomal).

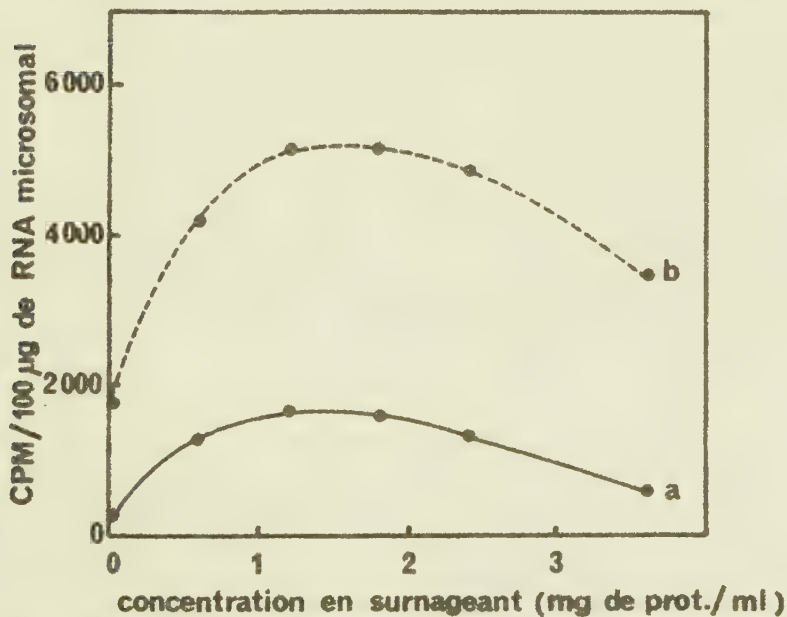


Fig. 29 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine en fonction de la concentration en surnageant 105 000 g.
a. - en absence de polyU
b. - en présence de 250 μg de polyU

de l'activité maximale pour un pH de 6 ou de 8 (figure 30).

Etant donné que les solutions de Tris ont un coefficient de dissociation élevé en fonction de la température, il est important de veiller à l'ajustement correct du pH des diverses solutions, de manière à obtenir un pH final de 7,0 pour le milieu d'incubation complet. Dans le cas du milieu utilisé (solutions A' et B' dans les proportions 3 : 5, v/v), le pH est abaissé de 0,20 pour une élévation de température de 15°C (figure 31).

Dans nos expériences, nous ajustons le pH des solutions A' et B' à 7,2 à la température ambiante de 22°C. Les autres solutions ATP, GTP, PEP etc, sont ajustées à pH 7,0 à 0°C. Dans ces conditions, le pH de la suspension microsomale mesuré à 0° atteint en général une valeur de 7,0 à 7,1. Le surnageant étant légèrement acide est ramené à pH 7,0. Ainsi le pH du milieu d'incubation complet, mesuré à 0°, se situe à $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$. Ceci revient à dire qu'à la température d'incubation de 37°, le pH optimum de la réaction est près de 6,5.

f) Influence de la concentration en Mg^{++} et K^+

Les expériences montrent que l'activité d'incorporation est très étroitement liée à la composition ionique du milieu d'incubation. De plus, il apparaît ici un phénomène important : la concentration ionique optimale n'est pas nécessairement la même en ce qui concerne l'activité propre et la stimulation par le poly U.

Le cation bivalent Mg^{++} joue notamment un rôle très important et sa concentration doit être ajustée d'une manière précise. En incubation directe, l'activité propre est maximale pour une concentration de 5,6 μM de Mg^{++} par ml de milieu réactionnel. A cette concentration, la stimulation par le poly U ne se traduit qu'à 60 p. 100 environ et la stimulation maximale est obtenue pour une concentration de 10 μM de Mg^{++} par ml de milieu d'incubation. En outre, si des concentrations trop faibles de Mg^{++} empêchent le fonctionnement optimal du système, un faible excès de cet ion réduit rapidement l'incorporation (figure 32).

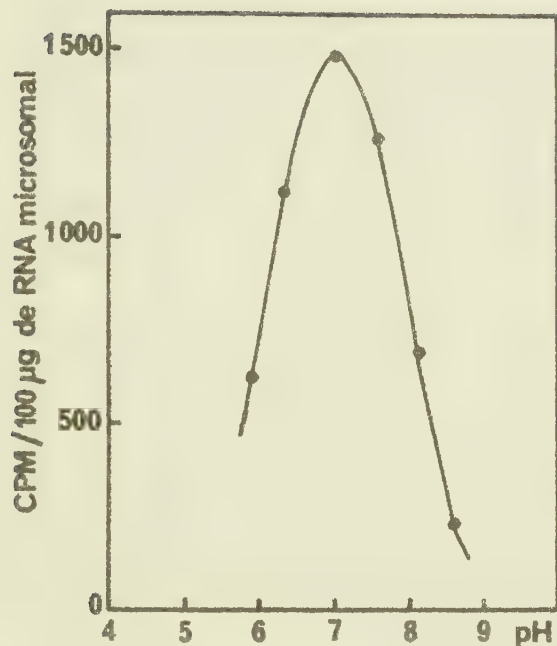


Fig. 30 - Effet du pH du milieu d'incubation sur l'incorporation de la ^{14}C -phénylalanine. (Le pH indiqué est le pH du milieu d'incubation complet mesuré à 0°C , directement dans les tubes avant l'incubation.)

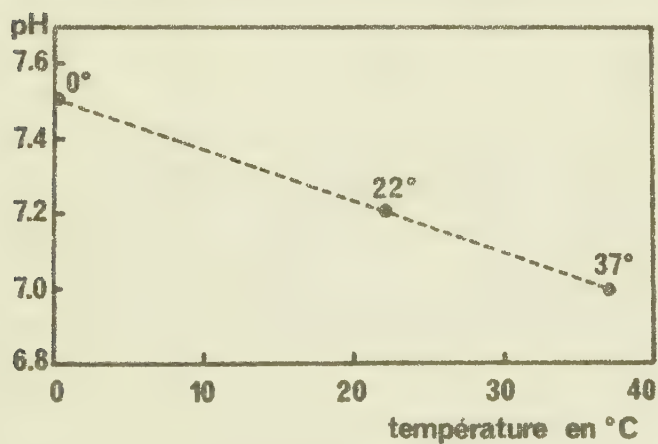


Fig. 31 - Variations du pH du milieu tampon (sol. A' + sol. B', 3:5, v/v) en fonction de la température.

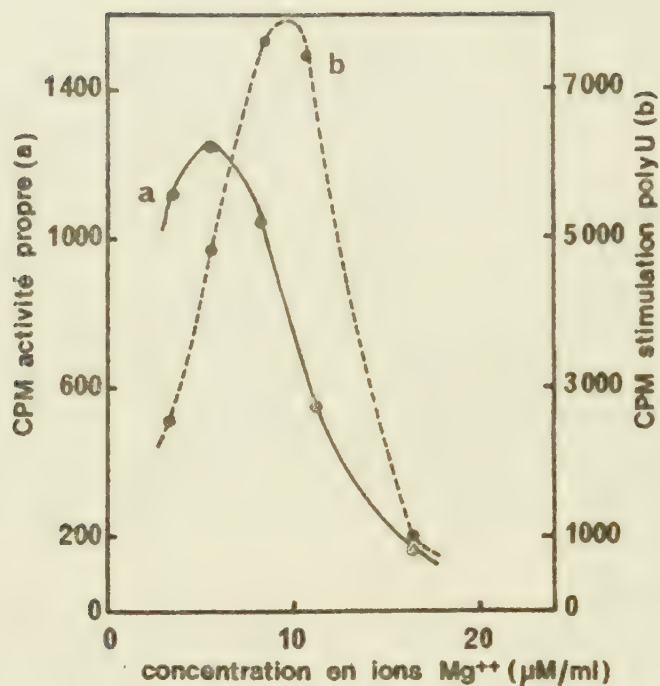


Fig. 32 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine (exprimée en CPM/100 μg de RNA microsomal) en fonction de la concentration en ions Mg^{++} .

a. - en absence de polyU

b. - en présence de 250 μg de polyU

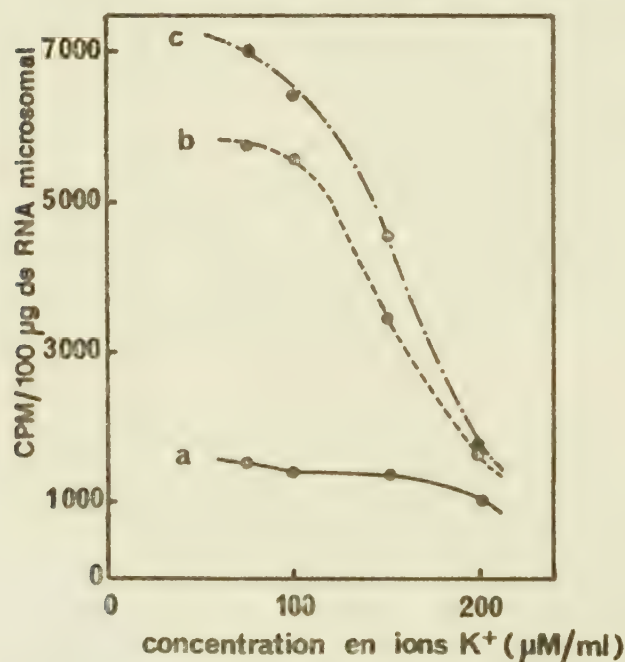


Fig. 33 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine, en fonction de la concentration en ions K^+ .

a. - en absence de polyU (activité propre)

b. - en présence de 250 μg de polyU (activité additionnelle)

c. - en présence de 250 μg de polyU après

Pour ce qui est de l'influence du cation K^+ , on constate que dans les limites des concentrations étudiées (75 à 200 $\mu M/ml$), celui-ci n'intervient que très peu au niveau de l'activité propre. Par contre, la stimulation par le poly U est nettement freinée, dès que la concentration de 100 $\mu M/ml$ de K^+ est dépassée. Cet effet est encore plus net pour la stimulation par le poly U dans le système préincubé (figure 33).

En ce qui concerne ces deux cations, les expériences démontrent clairement leur rôle de régulation assez fine, dans la traduction des RNA messagers. Un certain nombre d'études suggèrent que ces ions interviennent dans la fixation du mRNA sur les ribosomes. Il est permis de penser qu'un tel mécanisme intervient dans la cellule in vivo, dont l'activité est étroitement liée à la concentration ionique. On sait en outre qu'à l'intérieur même de la cellule, il existe des gradients de concentration ioniques et ceux-ci pourraient ainsi influencer la synthèse protéique selon les différentes régions du cytoplasme.

g) Influence de l'ATP et du système générateur d'ATP

L'activité propre d'incorporation de la phénylalanine en fonction de quantités croissantes d'ATP ou de PEP varie également selon des courbes en cloche (figures 34 et 35).

Pour l'ATP, la concentration optimale est de 0,5 à 1 μM par ml de milieu d'incubation. Des concentrations supérieures à 1 μM entraînent une chute rapide de l'activité d'incorporation. On note une incorporation assez forte (environ 60 p. 100 par rapport à l'optimum) sans ajouter d'ATP au milieu, et on peut de ce fait penser que les microsomes, durant leur isolement, retiennent une certaine quantité d'ATP ou de précurseurs énergétiques, probablement au niveau des membranes.

En absence de PEP par contre, le système ne fonctionne pratiquement pas. Par addition de PEP, l'incorporation augmente rapidement et atteint un maximum pour des concentrations de 5 à 10 μM de PEP par ml de milieu réactionnel.

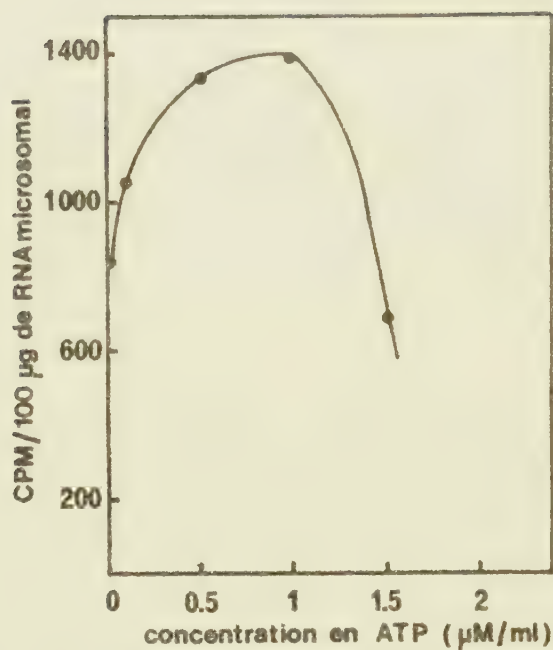


Fig. 34 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine en fonction de la quantité d'ATP ajouté au milieu réactionnel.

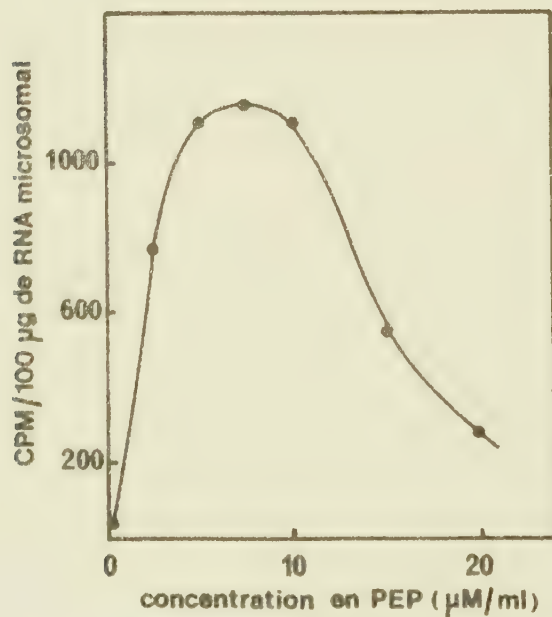


Fig. 35 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine en fonction de la quantité de PEP ajouté au milieu réactionnel.

Mais au-dessus de 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$, l'activité de synthèse protéique diminue rapidement. Ce système qui ne nécessite donc pas un apport d'ATP pour fonctionner partiellement, est très dépendant de l'apport de composés régénérateurs d'énergie tel que le PEP.

L'interprétation de l'effet inhibiteur d'un excès d'ATP ou de système générateur d'ATP est difficile. En réalité, il existe des relations complexes entre l'activité d'incorporation de ce système microsomal, les concentrations en composés générateurs d'énergie et les concentrations en ions Mg^{++} que nous étudierons au paragraphe suivant.

h) Effet synergique du système générateur d'énergie et des ions Mg^{++}

Nous venons de voir que l'addition au milieu d'incubation de quantités plus grandes de mélange générateur d'énergie que celles définies dans les conditions standard au paragraphe 2 a, entraînait une diminution considérable du taux d'incorporation des aminoacides. Ayant en outre constaté que pour un bon fonctionnement du système, la concentration en Mg^{++} devait être maintenue dans des limites étroites, on pouvait penser que l'action inhibitrice résultant de l'emploi de mélange générateur d'énergie en excès, était simplement due à l'effet bien connu de complexation du Mg^{++} par l'ATP.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à des expériences d'incorporation avec des doses croissantes d'énergie, en faisant varier pour chacune d'elle la concentration en Mg^{++} .

En ce qui concerne l'activité propre du système, les résultats montrent qu'en présence de doses élevées de système générateur d'énergie et malgré l'apport de quantités équimolaires de Mg^{++} , le taux d'incorporation est fortement diminué (figure 36). Cependant, on constate que pour des doses croissantes d'énergie, l'addition de Mg^{++} corrige partiellement le mauvais fonctionnement du système acellulaire. Toutefois, au-delà d'une dose d'énergie double de celle définie au paragraphe 2 a, l'incorporation diminue de plus en plus.

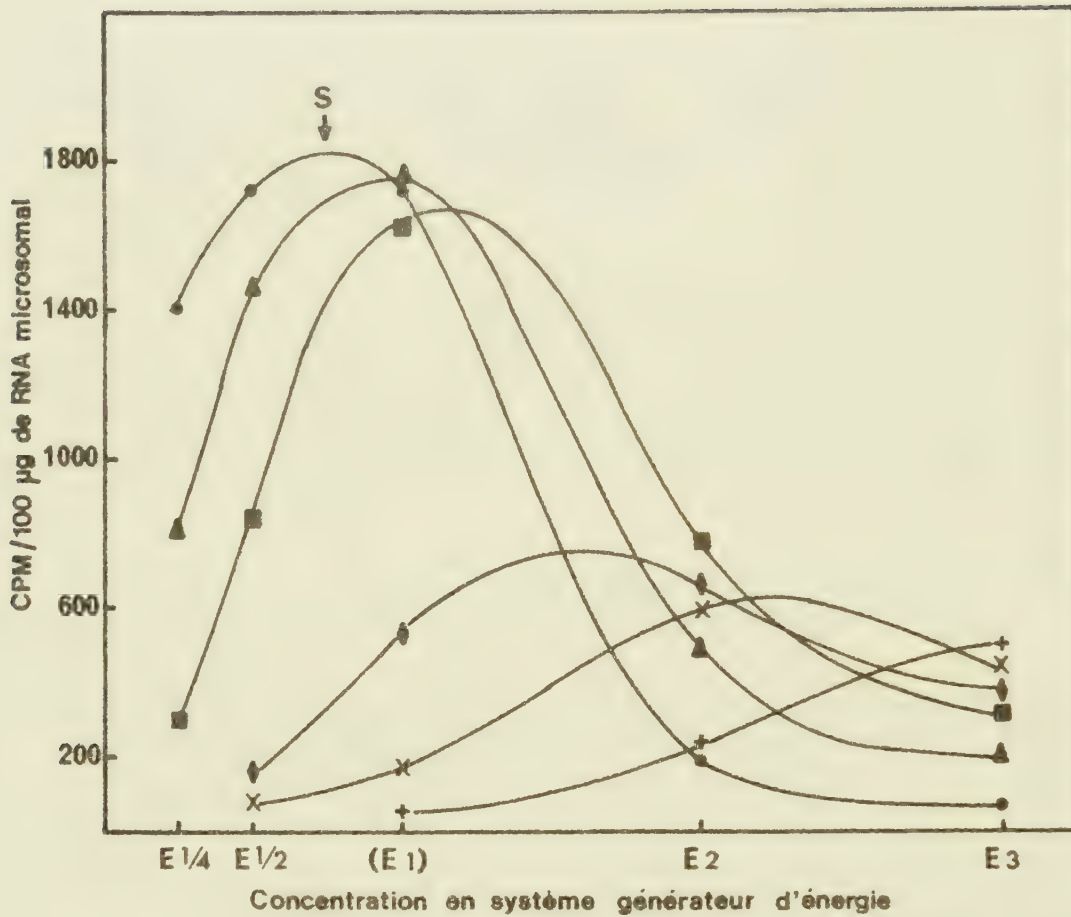


Fig. 36 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine en fonction de concentrations croissantes en système générateur d'énergie (ATP, GTP, PEP, PK) et pour différentes concentrations en ions Mg^{++} .

$\text{E}1$ - concentration standard en énergie

$\text{E}2$ - concentration double en énergie

$\text{E}3$ - concentration triple en énergie

$\text{E}1/2$ - concentration moitié en énergie

$\text{E}1/4$ - un quart de la concentration standard en énergie.

$\text{Mg}0$ - sans addition de Mg^{++} (concentration standard de $5,6 \mu\text{M}/\text{ml}$) •—•

$\text{Mg}1/2$ - addition de $2,8 \mu\text{M}$ de Mg^{++} par ml. ▲—▲

$\text{Mg}1$ - addition de $5,6 \mu\text{M}/\text{ml}$ ■—■

$\text{Mg}2$ - addition de $11,2 \mu\text{M}/\text{ml}$ ◆—◆

$\text{Mg}3$ - addition de $16,8 \mu\text{M}/\text{ml}$ x—x

$\text{Mg}5$ - addition de $28 \mu\text{M}/\text{ml}$ +—+

On peut donc conclure qu'il y a un effet de complexation du Mg^{++} par l'ATP, mais cet effet n'est certainement pas seul en cause.

Des expériences du même type dans lesquelles sont étudiées simultanément l'incorporation due au mRNA endogène et la stimulation par le poly U donnent des résultats semblables. Elles montrent en plus que la quantité de Mg^{++} nécessaire pour une dose d'énergie donnée est plus élevée pour obtenir une stimulation optimale par le poly U (figure 37). Mais il est important, pour obtenir une bonne stimulation par ce messenger exogène, de fournir au système une quantité d'énergie judicieusement définie. Pour la dose d'énergie E_2 par exemple, il y a une distorsion très grande entre la traduction du messenger endogène et celle du poly U en fonction de la concentration en ions Mg^{++} .

Il semble donc que les conditions optimales du milieu réactionnel ne soient pas les mêmes pour différents types de RNA messagers. La quantité d'ATP et celle de Mg^{++} notamment, peuvent avoir une influence sur la synthèse protéique et la traduction d'un mRNA donné. Mais il est probable que cet équilibre entre système générateur d'énergie et ions Mg^{++} , joue également un rôle au niveau de la fixation des aminoacides sur les tRNA. NOVELLI et coll. (1968) ont en effet montré que la valeur optimale du rapport Mg^{++}/ATP au cours de l'étude des capacités acceptrices des différents tRNA était variable suivant le tRNA spécifique considéré. L'activité de synthèse protéique serait en ce sens plus ou moins limitée selon un jeu complexe d'équilibres faisant intervenir divers facteurs.

i) Influence de la congélation des microsomes

Un certain nombre d'auteurs (FESSENDEN et coll., 1962) ont signalé qu'il était possible de congeler des préparations ribosomales à -60° pendant des temps assez longs sans que ce traitement diminue leur activité de synthèse protéique. Ce fait pourrait présenter un intérêt pratique en rendant possible la préparation simultanée et la conservation de microsomes en grande quantité à partir de plusieurs lots d'animaux se trouvant dans des conditions physiologiques différentes. Pour cette raison, nous avons vérifié si l'activité

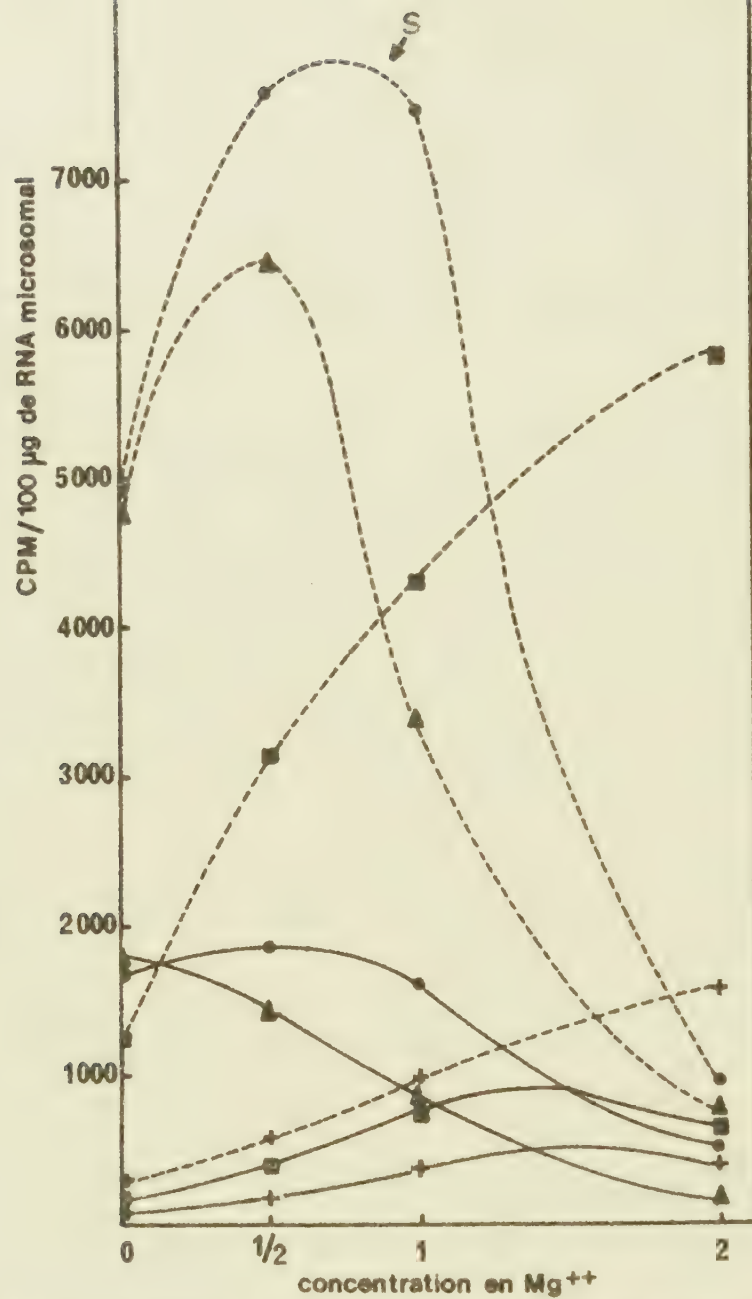


Fig. 37 - Incorporation de ¹⁴C-phénylalanine en fonction de concentrations croissantes en ions Mg⁺⁺, et pour différentes concentrations en système générateur d'énergie. (E^{1/2}, E₁, E₂, et E₃), en absence et en présence de PolyU.

Mg₀ - concentration standard (5,6 µM/ml)

Mg^{1/2} - addition de 2,8 µM/ml

Mg₁ - addition de 5,6 µM/ml

Mg₂ - addition de 11,2 µM/ml

	Act.pr.	St.polyU
E ₁ -concentration standard en énergie.	●—●	●- - -●
E ₂ - concentration double en énergie	■—■	■- - -■
E ₃ - conehtration triple en énergie	+—+	+ - - - +
E ^{1/2} - concentration moitié en énergie.	▲—▲	▲- - -▲

des microsomes, à la fois en ce qui concerne leur activité propre due au mRNA endogène et la stimulation par le poly U, était influencée par une congélation à -60° .

Les préparations microsomales congelées à -60° pendant 2 ou 3 semaines ne fonctionnent pratiquement plus, ni avec le messenger endogène en incubation directe, ni avec le poly U, après préincubation. Leur activité est irrégulièrement diminuée et se situe entre 5 à 20 p. 100 seulement de l'activité initiale des microsomes non congelés. Si on effectue une congélation de courte durée, 15 min. à -60° , suivie d'une décongélation rapide, on assiste à une chute de 40 à 50 p. 100 de l'activité propre des microsomes. Mais leur activité semble totalement conservée en ce qui concerne la stimulation par le Poly U après préincubation.

On peut donc conclure qu'il n'est pas possible de conserver les microsomes de foie par congélation étant donné que leur activité propre est dans tous les cas fortement diminuée. Cependant, pour des congélations de très courtes durées seulement, leur activité d'incorporation sous l'influence du poly U est totalement conservée. Ce fait pourrait présenter un intérêt en ce sens qu'il est possible de diminuer l'activité endogène par ce traitement, lorsqu'on veut étudier l'activité d'un RNA messenger exogène sans effectuer de préincubation.

j) Influence du suc nucléaire

Il convient de signaler un point très important relatif à la technique de préparation d'un tel système. Nous avons déjà indiqué plus haut (paragraphe 1 b) que lors du broyage des foies, il fallait opérer de manière à ne pas provoquer la rupture des noyaux. Or, ce risque est fortement accru si on remplace l'homogénéiseur de Potter par un appareil tel que le Virtis ou l'Ultra-Turrax. Une étude approfondie des conditions d'emploi de l'Ultra-Turrax pour le broyage du foie, nous a permis de mettre en évidence un phénomène d'inactivation de la capacité de synthèse des protéines par les microsomes. Nous décrivons ici les résultats d'un certain nombre d'expériences dans lesquelles nous avons comparé les activités d'incorporation des microsomes préparés à partir du même tissu hépatique par l'emploi de l'Ultra-Turrax ou de l'homogénéiseur de Potter.

En ce qui concerne l'emploi de l'Ultra-Turrax pour la préparation des fractions subcellulaires, la seule différence dans la technique employée, par rapport à celle décrite au chapitre VI - paragraphe 1 b, consiste à broyer le foie pendant 2 min. avec cet appareil fonctionnant sous une tension de 150 volts.

Les résultats d'une expérience de ce type sont indiqués dans le tableau VII.

T A B L E A U VII

Emploi de l'Ultra-Turrax pour la préparation des fractions subcellulaires. Influence sur l'incorporation de la ^{14}C -phénylalanine dans les protéines en absence et en présence de poly U

Conditions expérimentales	Activité propre CPM/100 µg de RNA	Activité additionnelle en présence de polyU. CPM/100 µg de RNA
$M_p + S_p$	1657	5952
$M_T + S_T$	529	645
$M_p + S_T$	1000	3248
$M_T + S_p$	592	1281

M_p et S_p = microsomes et surnageant 105.000 g préparés avec l'appareil de Potter

M_T et S_T = microsomes et surnageant 105.000 g préparés avec l'Ultra-Turrax.

On constate que les microsomes (M_T) préparés par l'emploi de l'Ultra-Turrax sont nettement moins actifs, à quantité égale de RNA microsomal, que les microsomes (M_P) préparés avec l'homogénéiseur de Potter. L'incorporation due au mRNA endogène, ainsi que celle due au poly U sont fortement diminuées. D'autre part, on constate que le surnageant 105.000 g préparé par l'emploi de l'Ultra-Turrax exerce également une action inhibitrice sur la synthèse protéique.

Le contrôle microscopique a montré que dans le cas du broyage du foie avec l'Ultra-Turrax, on provoquait la rupture d'un grand nombre de noyaux et on pouvait ainsi penser que l'inhibition de l'incorporation des aminoacides était due à un facteur nucléaire. Pour le vérifier, nous avons préparé un surnageant 105.000 g à partir d'un culot nucléaire brut 800 g (voir chapitre I, paragraphe 1). Les noyaux ont été broyés à l'Ultra-Turrax comme ci-dessus pendant 2 min. à 150 volts. L'homogénat a ensuite été purifié de la même manière que pour la préparation du surnageant 105.000 g cytoplasmique. Puis pour la constitution du milieu réactionnel, nous avons ajouté pour 100 μ g de RNA microsomal, 1 mg de protéines du surnageant 105.000 g cytoplasmique normal et 0,5 mg de protéines du surnageant 105.000 g nucléaire.

Dans ces expériences l'activité endogène du système d'incorporation est fortement diminuée, de 60 à 80 p. 100 par rapport au système normal. De même, la stimulation par le poly U en incubation directe est fortement réduite et après préincubation la stimulation est pratiquement annulée. Les résultats actuels nous permettent de penser que cette inactivation de la synthèse protéique acellulaire est bien imputable à un facteur intranucléaire soluble qui peut se trouver dans le surnageant 105.000 g lorsque l'on emploie l'Ultra-Turrax ; on constate que ce facteur possède une grande affinité pour les microsomes, car ces derniers sont inactivés par simple contact avec le surnageant 105.000 g nucléaire. Il ne semble pas que ce facteur soit un acide désoxyribonucléique de haut poids moléculaire, étant donné que l'addition de DNase au milieu d'incubation n'empêche pas cette action inhibitrice du surnageant nucléaire.

CHAPITRE VII

ACTIVITES DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE DES SYSTÈMES ACELLULAIRES SOUS L'INFLUENCE DE DIVERS RNA MESSAGERS

1. Activité du système microsomal

Au cours de la mise au point du système microsomal, nous avons déjà été amené à étudier quelques aspects limités du fonctionnement de ce système. C'est ainsi que nous avons étudié l'activité propre du système avec un seul acide aminé, la phénylalanine. Nous avons également vu l'effet d'un polynucléotide de synthèse, le poly U, sur l'incorporation de la phénylalanine. Nous allons à présent étudier d'une manière plus complète l'activité de ce système.

a) Etude de l'incorporation de divers aminoacides sous l'influence du RNA messager endogène

L'addition de divers ^{14}C -aminoacides (de même activité spécifique et à la même concentration molaire) dans le milieu d'incubation, montre d'emblée qu'ils ne sont pas incorporés aux mêmes taux, en présence du mRNA endogène.

Les expériences ont été réalisées avec la phénylalanine, la leucine, l'isoleucine, la sérine et l'histidine marqués au ^{14}C . L'activité spécifique est préalablement ajustée à la même valeur par dilution de l'aminoacide marqué avec la quantité nécessaire de l'aminoacide froid (dans nos expériences, les 5 acides aminés ont ainsi été ajustés à 63 mCi/mM). Puis on prépare 5 mélanges contenant chacun, l'aminoacide marqué et les 4 autres aminoacides froids à la même concentration molaire.

De cette manière, on peut comparer entre elles les incorporations de chacun des aminoacides (exprimées en CPM ou en μM) et se rendre compte si l'un d'entre eux est

incorporé proportionnellement plus ou moins que certains autres. On peut ainsi théoriquement en déduire la composition moyenne en aminoacide des protéines nouvellement synthétisées in vitro (tableau VIII).

T A B L E A U V I I I

Comparaison du taux d'incorporation de différents aminoacides avec la composition des protéines du foie

¹⁴ C-Aminoacide	Activité propre CPM/100 µg RNA	Composition calculée par rapport à l'histidine	Composition des protéines du foie µmole/mg	Composition calculée par rapport à l'histidine
Phénylalanine	568	1,71	0,333	1,73
Leucine	764	2,30	0,742	3,90
Isoleucine	680	2,05	0,397	2,10
Sérine	756	2,27	-	-
Histidine	336	1,00	0,193	1,00
Mélange des 5 aminoacides	3000	-	-	-

A titre de comparaison, considérons les données de HANKING et ROBERTS (1965) concernant la composition des protéines totales de foie de rat (tableau VIII, partie droite). Si on calcule la proportion relative des aminoacides incorporés dans les protéines (colonne 2), les valeurs trouvées vont dans le même sens que ceux obtenus par ces auteurs (colonne 4).

Ce résultat est un argument en faveur de la traduction normale du RNA messager endogène dans le système acellulaire microsomal et il semble donc possible d'entreprendre des études basées sur ce principe. On peut ainsi imaginer de

réaliser des expériences comparatives avec des microsomes provenant d'animaux normaux et d'animaux opérés ou traités par diverses hormones, afin de vérifier s'il est possible de déceler des variations dans la composition des protéines nouvellement synthétisées *in vitro*.

b) Stimulation de l'incorporation d'acides aminés par divers polynucléotides synthétiques

(a) Acide polyuridylique (poly U).

Nous avons déjà décrit plus haut un certain nombre d'expériences montrant que dans ce système acellulaire microsomal, la synthèse protéique pouvait être fortement stimulée par le poly U. Après préincubation et addition de ce polynucléotide, le système est capable de réaliser une synthèse exclusive de polyphénylalanine correspondant à une incorporation de phénylalanine marquée allant jusqu'à 150 $\mu\mu$ moles par ml de milieu réactionnel ou par 100 μg de RNA microsomal (tableau VI). Cette incorporation est fonction de la quantité de poly U ajoutée au système et croît jusqu'à un niveau de saturation atteint pour 250 μg de poly U par ml de milieu réactionnel (figure 38). La stimulation est pratiquement linéaire jusqu'à 100 μg de poly U par ml de milieu d'incubation. L'incorporation de phénylalanine en présence de poly U dans le système préincubé est en moyenne 60 fois supérieure à l'incorporation obtenue en absence de ce polynucléotide.

Nous avons vérifié que parmi les acides aminés étudiés (phénylalanine, leucine, isoleucine, sérine et histidine), seule la phénylalanine était incorporée en présence de poly U par les microsomes préincubés, ce qui est en accord avec le code génétique établi dans le système ribosomal d'*E. coli* (NIRENBERG et MATTHAEI, 1961) où le triplet UUU ne code que pour la phénylalanine.

Des essais réalisés avec deux échantillons différents de Poly U, en l'occurrence un sel de K^+ et un sel d' NH_4^+ , de longueur de chaîne identique, ont montré que les deux polynucléotides stimulaient l'incorporation de phénylalanine de la même manière.

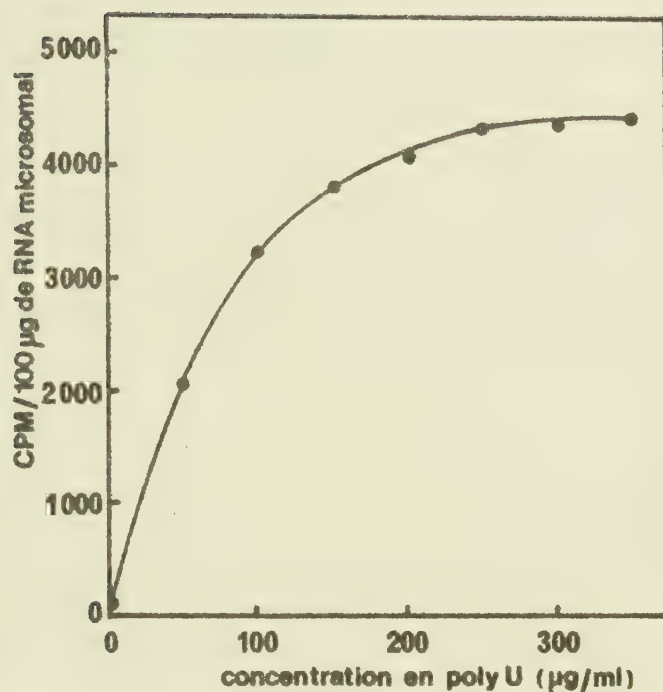


Fig. 38 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine en fonction de la quantité de polyU ajouté au milieu réactionnel pré-incubé.

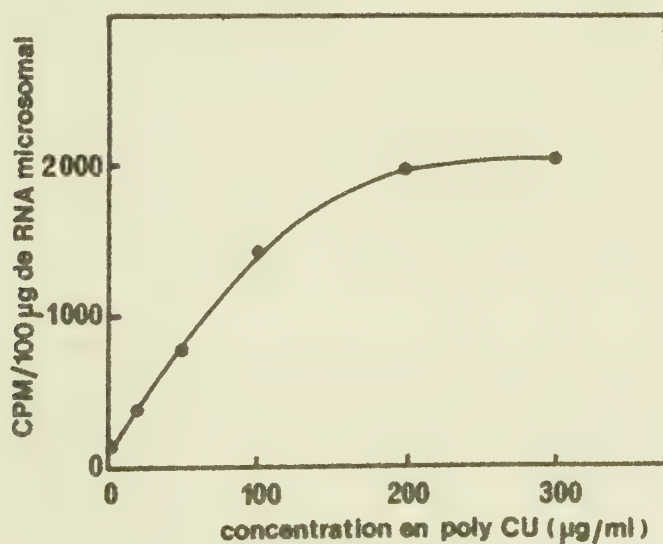


Fig. 39 - Incorporation de ^{14}C -Leucine à 131 mCi/mM ($1\mu\text{Ci/ml}$) en fonction de la quantité de polyCU ajouté au milieu réactionnel préincubé.

(β) Acide polycytidylique-uridylique (poly CU).

Nous avons effectué quelques expériences en utilisant comme RNA messenger exogène, le poly CU. Dans ce polynucléotide de synthèse, les bases sont réparties au hasard et peuvent se succéder de manière à faire apparaître les codons suivants : U U U, U U C correspondant à la phénylalanine ; C C C, C C U codant pour la proline, C U U, C U C pour la leucine ; U C C, U C U pour la sérine. Les essais d'incorporation ont été réalisés avec la leucine, la sérine et la phénylalanine.

Comme avec le poly U, nous avons constaté que le poly C U stimule l'incorporation de la ^{14}C -leucine dans le système préincubé en fonction de la quantité de polyribonucléotide ajouté (figure 39). La stimulation est linéaire jusqu'à 100 μg de poly CU par ml de milieu réactionnel et atteint un niveau de saturation pour environ 200 μg . Cependant, la quantité de ^{14}C -leucine incorporée reste relativement faible et en moyenne le facteur de stimulation est égal à 1,4 seulement avec les microsomes non préincubés et à 12 avec les microsomes préincubés (figure 40).

La figure 40 montre également que les cinétiques d'incorporation de la leucine, de la sérine et de la phénylalanine, en présence de poly CU dans le système non préincubé et dans le système préincubé sont semblables à celles observées avec les mêmes aminoacides en absence de poly CU et correspondant à l'activité propre du système. En utilisant chacun de ces 3 aminoacides séparément, nous avons confirmé que le poly CU codait pour chacun d'entre eux, la leucine et la sérine étant incorporées à peu près au même taux et la phénylalanine au taux de 25 p. 100 par rapport aux aminoacides précédents.

(γ) Acide polyadénylique-uridylique-cytidylique (poly A U C).

En utilisant un polyribonucléotide synthétique plus complexe, le poly A U C, nous avons constaté que sa capacité de stimulation de l'incorporation était encore plus faible que celle du poly CU. La stimulation additionnelle dans le système non préincubé est pratiquement nulle et après préincubation le facteur de stimulation n'est plus que de 8 (figure 41).

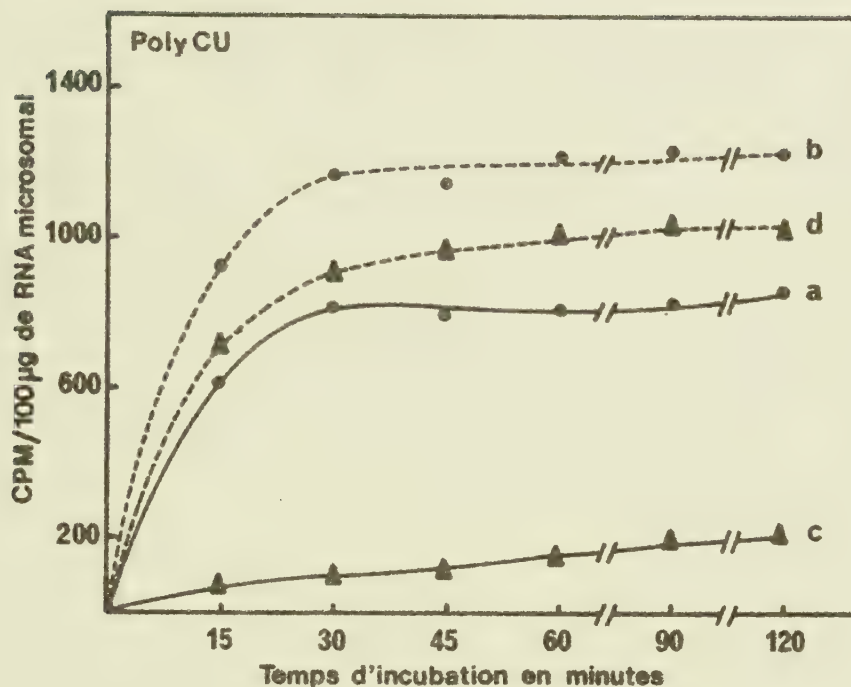


Fig. 40 - Incorporation des aminoacides (1 μ Ci/ml d'un mélange dans le rapport 1/3:1/3:1/3 de 14 C-Leucine + 14 C-sérine + 14 C-phénylalanine, à 61,3 mCi/mM) dans les protéines en fonction du temps d'incubation;

- a. - activité propre (messenger endogène)
- b. - activité additionnelle en présence de 150 μ g/ml de polyCU
- c. - activité résiduelle après préincubation de 15 min.
- d. - stimulation après préincubation en présence de 150 μ g/ml de polyCU.

Les expériences effectuées avec l'isoleucine, la leucine, la sérine et l'histidine, montrent que le poly A U C stimule faiblement l'incorporation de ces 4 aminoacides. En valeur absolue, l'incorporation en présence de poly A U C dans le système préincubé est très inférieure à l'activité propre.

Il semble donc que plus la complexité du polynucléotide augmente, plus son activité de stimulation de la synthèse protéique dans le système microsomal diminue. Ceci peut s'interpréter en admettant que les copolymères (poly C U et poly A U C) se lient moins facilement aux ribosomes que l'homopo-

lymère (poly U). Or, le processus d'attachement des polymères aux ribosomes constitue une étape essentielle pour la catalyse de l'incorporation des acides aminés. Il a été montré avec le système ribosomal d'*E. coli*, que les incorporations observées en présence de copolymères sont toujours plus faibles qu'avec le poly U (SINGER et coll., 1963 ; GRUNBERG-MANAGO et GROS, 1964). On sait par ailleurs que les polymères qui présentent une structure secondaire ne stimulent plus l'incorporation des aminoacides dans les protéines, notamment le complexe A + U (TAKANAMI et OKAMOTO, 1963). Il est donc possible que les copolymères soient moins actifs dans le système microsomal de foie de rat, non parce qu'ils ne possèdent pas de codons appropriés, mais à cause de leur structure secondaire.

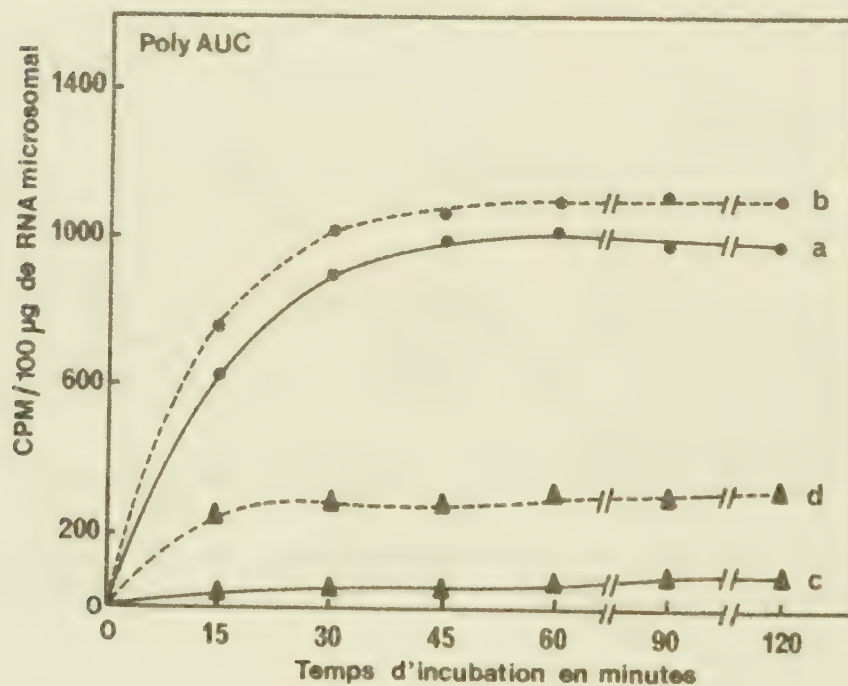


Fig. 41 - Incorporation des aminoacides (1 μ Ci/ml d'un mélange dans le rapport 1/4:1/4:1/4:1/4 de 14 C-isoleucine + 14 C-leucine + 14 C-sérine + 14 C-histidine, à 61,3 mCi/mM) dans les protéines en fonction du temps d'incubation :

- a. - activité propre (messenger endogène)
- b. - activité additionnelle, en présence de 150 μ g/ml de polyAUC
- c. - activité résiduelle après préincubation de 15 min.
- d. - stimulation après préincubation en présence de 150 μ g/ml de polyAUC.

c) Stimulation de l'incorporation d'acides aminés
sous l'influence de RNA messagers naturels

Nous avons vu dans les deux paragraphes précédents que le système microsomal utilisé dans des conditions bien définies présentait une bonne capacité d'incorporation des acides aminés codés par le RNA messager endogène lié aux microsomes au moment de leur isolement. De même, après épuisement du mRNA endogène par préincubation, les microsomes conservent la capacité d'entrer en combinaison avec un nouveau messager ajouté au système, par exemple le poly U, le poly C U ou le poly A U C et incorporent les acides aminés codés par ces messagers dans les protéines nouvellement synthétisées. Nous avons cependant montré que cette activité de néosynthèse protéique induite par ces polyribonucléotides diminuait progressivement avec la complexité des polymères utilisés comme messagers. Cette diminution d'activité pouvant s'expliquer comme nous l'avons déjà signalé par le fait qu'un RNA possédant une structure secondaire pouvait difficilement se combiner aux ribosomes pour former des polysomes. Une découverte plus récente (REVEL et GROS, 1966) a établi que la traduction d'un RNA complexe dans le système ribosomal d'*E. coli* nécessitait la présence de facteurs d'initiation de la lecture. En effet, il est important du point de vue biologique que la traduction d'un mRNA commence par le codon d'origine du mRNA lorsque ce dernier est constitué par une suite séquentielle hétérogène. Dans cette optique, le problème de l'initiation ne semble pas se poser pour un messager simple tel que le poly U qui fait intervenir une seule base dans la séquence et pour lequel tous les codons sont identiques.

La stimulation de plus en plus faible de la synthèse protéique in vitro par des polyribonucléotides de synthèse de complexité de structure croissante, laisse présager de grandes difficultés pour l'obtention d'une stimulation appréciable par les RNA messagers naturels dans les systèmes acellulaires tels qu'ils sont actuellement utilisés. Cependant, un certain nombre d'études ont été effectuées en vue de tester la capacité de stimulation de divers mRNA naturels.

Pendant assez longtemps, on a cru que le mRNA était essentiellement constitué par les RNA à marquage rapide et les premiers résultats chez les bactéries (GROS et coll. 1961) semblaient indiquer qu'il serait possible de séparer ce RNA à marquage rapide des autres RNA cellulaires (rRNA et tRNA) dans un gradient de concentration de saccharose.

Certains auteurs (BAUTZ, 1963 ; GROS et coll. 1963) ont d'ailleurs montré que ce RNA à marquage rapide de constantes de sédimentation 9-12 S stimulait l'incorporation des aminoacides dans les protéines lorsqu'il était ajouté dans un système ribosomal d'*E. coli* alors que les autres constituants (28 S, 18 S et 4 S) étaient inactifs. Cependant, la découverte de l'existence de RNA messagers stables (KRUH et coll. 1966) et de RNA messagers à marquage rapide lourds (SCHERRER et coll. 1966 ; BUSCH et coll. 1966 ; GEORGIEV, 1966) dans les tissus de vertébrés supérieurs est venue rapidement augmenter la complexité de cette question. On peut toutefois noter que des résultats très démonstratifs ont été obtenus avec des RNA viraux (CLARK et coll. 1965) pour lesquels il a été clairement montré que l'addition de ces RNA dans un système d'*E. coli* aboutissait à une néosynthèse spécifique des protéines de la capside virale.

A la lumière de ces résultats, nous nous sommes proposé d'envisager sous cet angle l'hypothèse de l'action directe des hormones au niveau du RNA messager. C'est dans ce sens que nous avons entrepris un certain nombre d'études avec des RNA nucléaires ou cytoplasmiques de foie de rat en ce qui concerne leur capacité de stimulation de la synthèse protéique dans le système acellulaire microsomal.

(α) Nature des RNA étudiés.

Nous ne décrirons ici que les expériences effectuées avec des RNA homologues, c'est-à-dire des RNA extraits à partir de foie de rat.

Nous avons d'une part testé la capacité de stimulation de divers RNA préparés dans les conditions décrites au chapitre II, paragraphe 1 ; nous avons généralement comparé l'activité des RNA nucléaires à celle des RNA cytoplasmiques provenant des mêmes foies.

D'autre part, nous avons comparé des RNA préparés par extraction phénolique soit à chaud selon la méthode de SCHERRER et DARNELL (1962), soit à la température ambiante selon la méthode de SPORN et DINGMAN (1963).

De plus, pour une même préparation de RNA, nous avons comparé la stimulation en présence du RNA total, du RNA ribosomal isolé par un traitement au NaCl 2 M et du RNA soluble.

Enfin, nous avons testé les différentes fractions d'un même RNA séparées par centrifugation dans un gradient de saccharose : les fractions lourdes de constantes de sédimentation supérieures à 28 S, les fractions 28 S et 18 S du rRNA, la fraction sédimentant entre les constituants 18 S et 5 S et la fraction contenant le RNA soluble 4 S.

Ces différents RNA ou fractions de RNA ont été testés en ce qui concerne leur capacité de stimulation additionnelle dans le système microsomal non préincubé et leur capacité de stimulation dans le système préincubé après épuisement du mRNA endogène. Etant donné les stimulations pratiquement nulles dans ce dernier cas, nous avons également effectué diverses études en vue de préciser éventuellement les causes de l'absence d'activité après préincubation.

(8) Activité additionnelle du système microsomal non préincubé en présence de RNA messagers naturels.

L'addition de RNA nucléaire ou cytoplasmique total extrait par la méthode de SCHERRER et DARNELL ne stimule pas et parfois inhibe plus ou moins fortement l'activité d'incorporation de la ^{14}C -leucine.

Par contre, en fractionnant préalablement ces mêmes RNA par un traitement au NaCl 2 M permettant la séparation du RNA ribosomal et du RNA soluble, on constate que le rRNA augmente toujours l'incorporation des aminoacides, de 15 à 50 p. 100 selon les préparations, alors que le sRNA inhibe toujours très fortement la synthèse protéique. Le tableau IX rend compte d'une telle expérience.

T A B L E A U IX

Incorporation de ^{14}C -leucine dans les protéines
Activité propre et activité additionnelle en présence de RNA
de foie de rat préparé par la méthode de SCHERRER et DARNELL

Conditions expérimentales	^{14}C -leucine incorporée (CPM/100 μg de RNA microsomal)
Témoins	25
Incubation en absence :	
- de RNA exogène (Activité propre)	1998
Incubation après addition :	
- de 130 μg de RNA nucléaire total	644
- de 130 μg de rRNA nucléaire	2450
- de 50 μg de sRNA nucléaire	441
- de 120 μg de RNA cytoplasmique total	1990
- de 120 μg de rRNA cytoplasmique	2500
- de 60 μg de sRNA cytoplasmique	1250

Il ne nous est actuellement pas possible d'expliquer cet effet inhibiteur de la fraction soluble, non précipitable par le NaCl 2 M du RNA cytoplasmique ou nucléaire. On peut noter que surtout le sRNA obtenu à partir du RNA nucléaire présente cet effet inhibiteur et il semble que ce dernier soit plus important lorsque les RNA sont extraits à chaud par la méthode de SCHERRER et DARNELL.

Une interprétation peut être formulée à partir des expériences de GRUNBERG-MANAGO et DONDON (1965) réalisées avec un système d'*E. coli* montrant qu'un excès de sRNA peut inhiber

complètement l'incorporation d'un acide aminé et que la quantité optimale varie d'un acide aminé à l'autre. Une autre possibilité est celle décrite par AARONSON et coll. (1966) qui ont trouvé ce même effet inhibiteur du sRNA dans un système ribosomal de foie de rat et montré que l'effet n'était pas dû au RNA de transfert mais à un composant associé à ce dernier pouvant être séparé par chromatographie sur colonne de Sephadex G-100.

En ce qui concerne la fraction de RNA précipitable par le NaCl 2 M, contenant le RNA ribosomal et les fractions de RNA lourd, la stimulation est très variable et dans les meilleurs cas, nous avons observé une augmentation de 54 p. 100 de l'incorporation de ^{14}C -leucine avec un RNA cytoplasmique préparé par la méthode de SCHERRER et DARNELL. Les études effectuées avec plusieurs aminoacides, par exemple un hydrolysât de chlorelles* ou un mélange de dix ^{14}C -aminoacides (phénylalanine, leucine, sérine, valine, lysine, proline, histidine, isoleucine, arginine et alanine) n'ont pas conduit à des incorporations significativement plus élevées (maximum 68 p. 100 d'augmentation). D'autre part, il faut remarquer que les RNA cytoplasmiques stimulent généralement aussi bien, sinon mieux que les RNA nucléaires. Aucune différence systématique de la stimulation n'a pu être mise en évidence entre des RNA nucléaires ou cytoplasmiques et préparés soit par la méthode d'extraction à chaud de SCHERRER et DARNELL ou par celle de SPORN et DINGMAN.

On peut retenir de ces expériences que pour étudier la capacité de stimulation d'un RNA préparé par les méthodes d'extraction phénoliques, il est important d'écarter la fraction correspondant au RNA soluble étant donné que ce dernier entraîne en général une forte inhibition de l'activité d'incorporation du système acellulaire microsomal.

Dans une autre série d'expériences, afin d'avoir une notion plus précise de la capacité de stimulation des mRNA naturels, nous avons fractionné les RNA par centrifugation dans un gradient de concentration de saccharose. Pour cette étude, 8 mg de RNA isolé par le traitement au NaCl 2 M sont déposés sur un gradient de 50 ml de saccharose 5-40 p.100

* hydrolysât de chlorelles en provenance d'Amersham G.B. ;
activité spécifique : 500 $\mu\text{Ci}/3,45 \text{ mg}$.

et centrifugés pendant 17 h à 24.000 t/min. dans le rotor Spinco SW 25-2. On récupère des fractions de 11 gouttes (environ 2 ml) comme indiqué dans le chapitre II-paragraphe 2. Une goutte de chaque fraction est utilisée pour la détermination du profil d'absorption à l'U.V. Puis les diverses fractions sont rassemblées en 5 parties comme indiqué dans la figure 42 et reprécipitées par l'éthanol à -20° . Les précipités de RNA sont récupérés par centrifugation, lavés et redissous dans l'eau distillée à une concentration de 2 mg de RNA par ml. Une quantité équivalente de RNA provenant de chacune de ces 5 fractions est additionnée au milieu réactionnel d'incubation microsomal afin de tester la capacité de stimulation de chacune des fractions.

Les figures 42, 43 et 44 indiquent les résultats obtenus. Nous ne pouvons actuellement tirer de conclusions valables de ces expériences. On constate selon les diverses préparations de RNA que les stimulations sont variables pour les différentes fractions. Tous les RNA nucléaires représentés dans ces figures ont été préparés dans les conditions habituelles permettant l'obtention de RNA à marquage rapide lourd. Or, selon les préparations, la fraction de RNA lourd (fraction I) stimule plus ou moins bien ou ne stimule pas l'incorporation de ^{14}C -leucine. De plus, les fractions très légères (fraction V), de constantes de sédimentation égales ou inférieures à 4 S, stimulent également cette incorporation alors que les composants en question ne sont jamais marqués dans les conditions de préparation de ces RNA. Il en est de même pour les RNA cytoplasmiques ; les stimulations sont variables selon les préparations de RNA. De plus, les fractions légères (fraction V) du RNA cytoplasmique préalablement traité au NaCl 2 M, présentent en général les meilleures capacités de stimulation.

Nos résultats peuvent être rapprochés de ceux de DIGIROLAMO et coll. (1964, 1966, 1967). Ces auteurs ont montré que seulement le RNA nucléaire de foie de rat stimulait l'incorporation de ^{14}C -valine dans un système acellulaire S-30 d'*E. coli* avec un maximum (8 μM de valine incorporée) pour la fraction 16 S. Dans un autre travail, ils obtiennent un maximum d'incorporation pour la fraction de RNA nucléaire de foie comprise entre 16 S et 4 S provenant d'animaux normaux et pour la fraction 28 S dans le cas d'un RNA nucléaire de foie d'animaux soumis à un jeûne protéique. Enfin, dans une publication plus récente, ils signalent un maximum d'in-

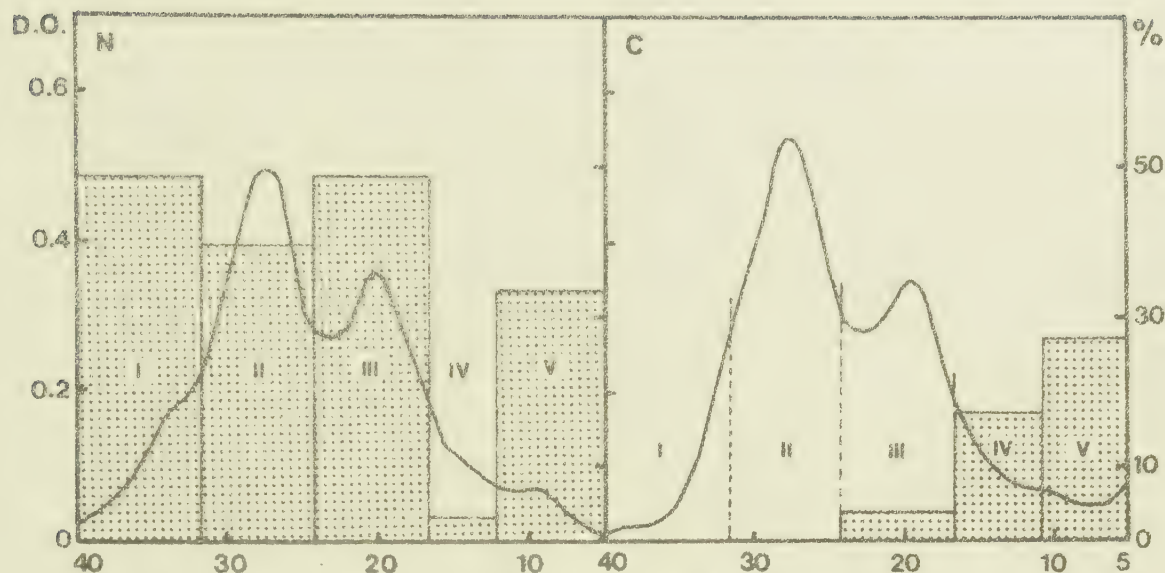


Fig. 42 - Incorporation additionnelle de ^{14}C -leucine dans les protéines en présence des fractions (I à V) d'un RNA nucléaire (N) et d'un RNA cytoplasmique (C) extraits par la technique de SCHERRER et DARNELL. (Foie normal).

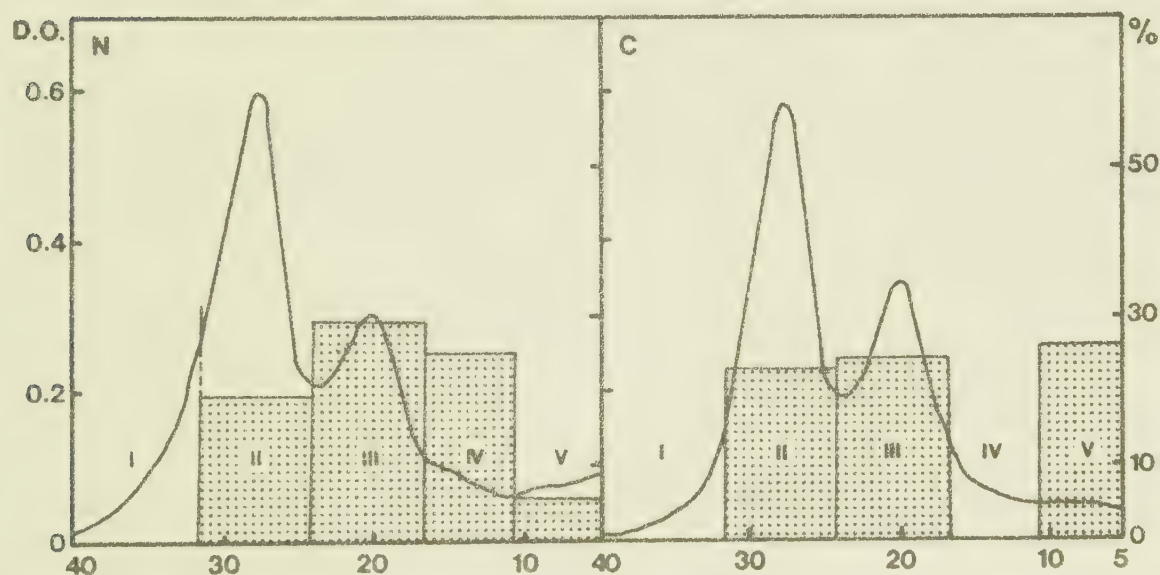


Fig. 43 - Incorporation additionnelle de ^{14}C -leucine dans les protéines en présence des différentes fractions d'un RNA nucléaire (N) et d'un RNA cytoplasmique (C) extraits par la technique de SPORN et DINGMANN. (Foie normal).

Les colonnes ombrées représentent le pourcentage de stimulation additionnelle en présence de 100 μg de RNA de chacune des fractions, par ml de milieu réactionnel.

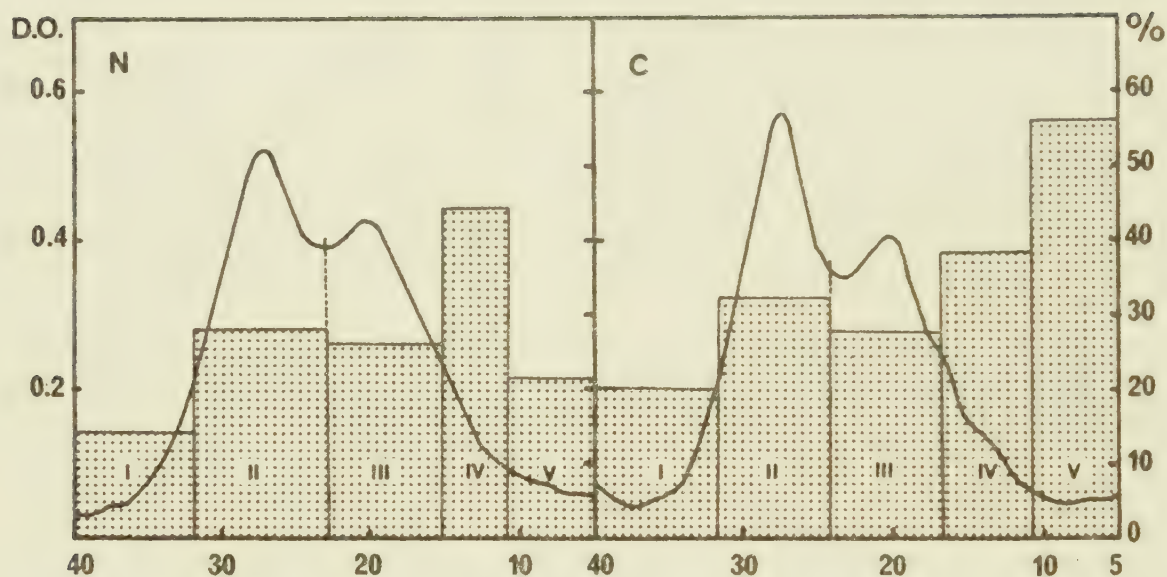


Fig. 44 - Incorporation additionnelle de ^{14}C -leucine en présence des différentes fractions d'un RNA nucléaire (N) et cytoplasmique (C) de foies d'embryons de 20 jours, extraits par la technique de SCHERRER et DARNELL.

corporation (25 μM de valine) pour les fractions 28 S et 16 S d'un RNA cytoplasmique polysomal de foie d'animaux normaux. De leur côté, BRAWERMAN et coll. (1963, 1965 a, 1965 b, 1967) ont réalisé certaines expériences relatives à la stimulation de l'incorporation de ^{14}C -leucine par des RNA nucléaires de foie de rat dans un système ribosomal S-30 d'*E. coli*. Ils aboutissent à des résultats extrêmement variables et souvent contradictoires. Si d'une manière générale ces auteurs ont parfois tiré des conclusions sur le plan physiologique, nous sommes de l'avis que ces résultats doivent être considérés avec une grande prudence. En effet, il ressort clairement de nos propres expériences assez nombreuses, que les résultats de stimulation additionnelle par des mRNA naturels ne sont pas reproductibles d'une préparation à l'autre, et, qu'à l'heure actuelle il reste de nombreux problèmes à élucider.

(γ) Activité du système microsomal préincubé, en présence de RNA messagers naturels.

Alors que dans le système microsomal non préincubé on observe une faible stimulation par les RNA naturels correspondant dans les meilleurs cas à une augmentation de 50 p. 100 de l'incorporation de la ^{14}C -leucine (ce qui représente en moyenne de 20 à 30 μM de leucine incorporée en plus par 100 μg de RNA microsomal), nous n'avons jamais pu mettre en évidence une véritable stimulation par ces RNA après préincubation des microsomes. Le tableau X relate une expérience de ce type. On constate que la stimulation après préincubation ne peut pas être considérée comme significative ; elle ne représente au maximum que 3 μM de phénylalanine incorporée alors que l'activité propre représentait dans ce cas 68 μM d'acide aminé incorporé.

A la suite de ces résultats négatifs, nous avons cependant effectué un certain nombre d'expériences, afin de vérifier dans quelle mesure certaines conditions expérimentales pouvaient intervenir dans la stimulation de la synthèse protéique par les mRNA naturels.

T A B L E A U X

Incorporation de ^{14}C phénylalanine en présence de
Poly U et de mRNA naturels nucléaire ou cytoplasmique

Conditions d'incubation	^{14}C -phénylalanine incorporée (CPM/100 μg de RNA microsomal)
Témoins	40
Incubation directe (Activité propre)	2174
Préincubation de 15 min. (activité résiduelle)	103
Incubation + 250 μg de Poly U (stimu- lation)	6360
Préincubation + 40 μg de RNA nucléaire	115
190 μg de RNA nucléaire	127
380 μg de RNA nucléaire	118
Préincubation + 40 μg de RNA cytoplas- mique	122
220 μg de RNA cytoplas- mique	132
440 μg de RNA cytoplas- mique	126

Le RNA nucléaire étudié a été préparé à partir de noyaux de type CHAUVÉAU. Les RNA nucléaire et cytoplasmique ont été extraits par la technique de SCHERRER et DARNELL puis traités par NaCl 2 M en vue de l'élimination du sRNA.

(6) Etude de l'influence de certains facteurs expérimentaux sur la stimulation par les mRNA naturels.

- Stimulation en fonction de la quantité de RNA ajouté dans le milieu d'incubation.

Jusqu'à 100 μ g de RNA, l'incorporation des amino-acides augmente en fonction de la quantité de RNA ajouté, comme on peut le voir dans la figure 45. Pour des quantités supérieures, la stimulation diminue progressivement et au-delà de 500 μ g on observe une inhibition de la synthèse protéique qui est pratiquement annulée pour une addition de 2 mg de RNA.

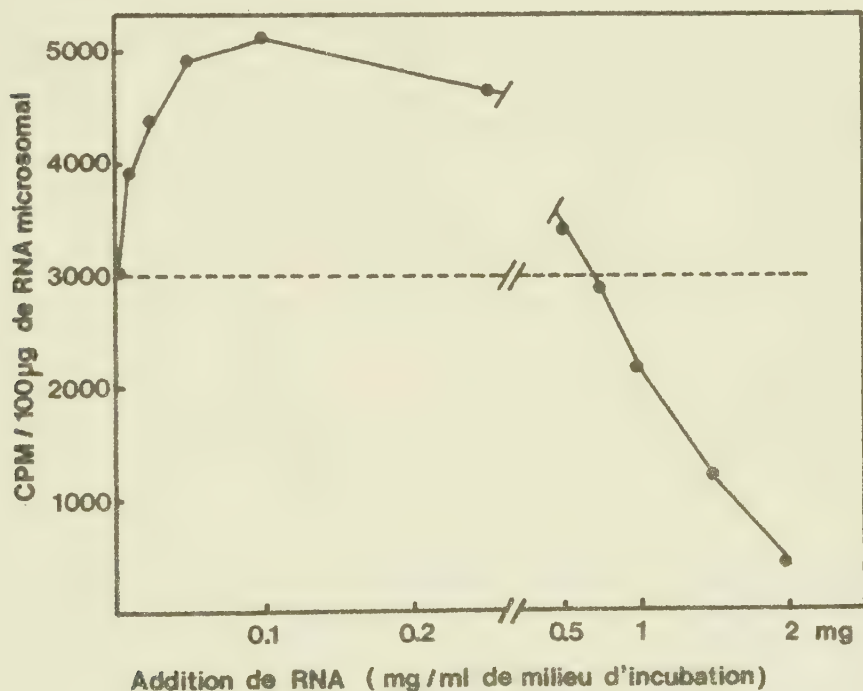


Fig. 45 - Incorporation additionnelle des amino-acides (1 μ Ci/ml d'un mélange de dix aminoacides) dans les protéines en présence d'un RNA naturel (RNA cytoplasmique, extraction SPORN)

- — ● activité en présence de RNA exogène
- activité propre (témoin) sans addition de RNA exogène

D'après ces résultats, il ne semble pas que le RNA ajouté facilite la traduction du mRNA endogène. Il semblerait plutôt qu'à partir d'une certaine concentration, celui-ci pourrait entrer en compétition avec le mRNA endogène en bloquant les sites de fixation ou en empêchant le déroulement de la lecture. La diminution de l'incorporation entraînée par l'addition de fortes quantités de RNA pourrait également s'expliquer par la présence éventuelle d'impuretés ou de substances inhibitrices dans le RNA ajouté, mais cela semble peu probable.

- Stimulation par les mRNA naturels en fonction de la concentration en protéines enzymatiques.

La figure 46 montre que la quantité optimale de protéines enzymatiques est sensiblement la même, qu'il s'agisse de la stimulation par le RNA exogène ou de l'activité propre (voir chapitre VI, paragraphe 3 b). Cependant, la stimulation est moins importante pour les concentrations inférieures à 0,5 mg et supérieures à 1,5 mg de protéines enzymatiques pour 100 μ g de RNA microsomal ou 1 ml de milieu réactionnel.

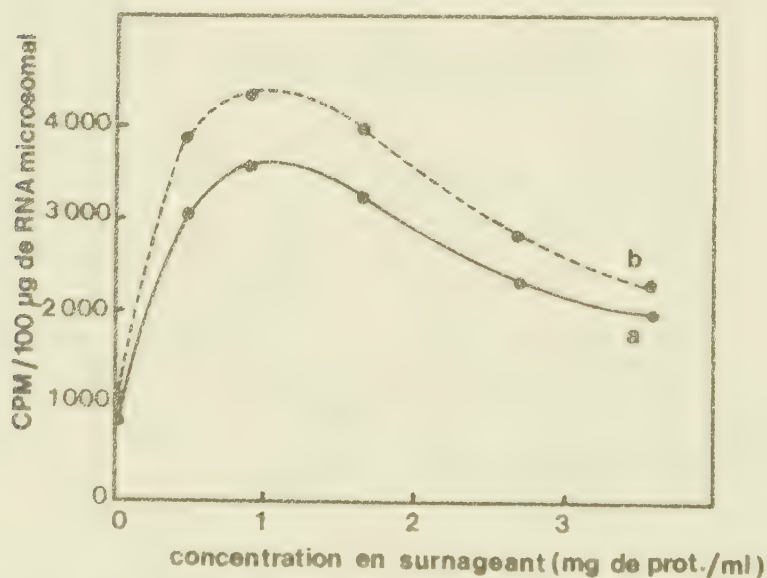


Fig. 46 - Stimulation additionnelle par un RNA naturel (RNA nucléaire, extraction SPORN) en fonction de la concentration du surnageant 105 000g.
Incorporation des aminoacides (1 μ Cl/ml d'un mélange de dix 14 C-aminoacides) :

- a. - sans addition de RNA
- b. - après addition de 100 μ g/ml de RNA naturel

- Influence de la concentration en énergie et en ions Mg^{++} sur la capacité de stimulation.

Comme l'activité propre et la stimulation par le poly U, la stimulation par le mRNA naturel dépend également des concentrations relatives en Mg^{++} et en système générateur d'énergie. On constate (figure 47) que la stimulation est maximale en présence de la dose d'énergie habituelle et à une concentration de $8,5 \mu M/ml$ de Mg^{++} . Cette dernière se situe entre les valeurs optimales pour l'incorporation due au mRNA endogène ($5,6 \mu M/ml$) ou au Poly U ($10 \mu M/ml$).

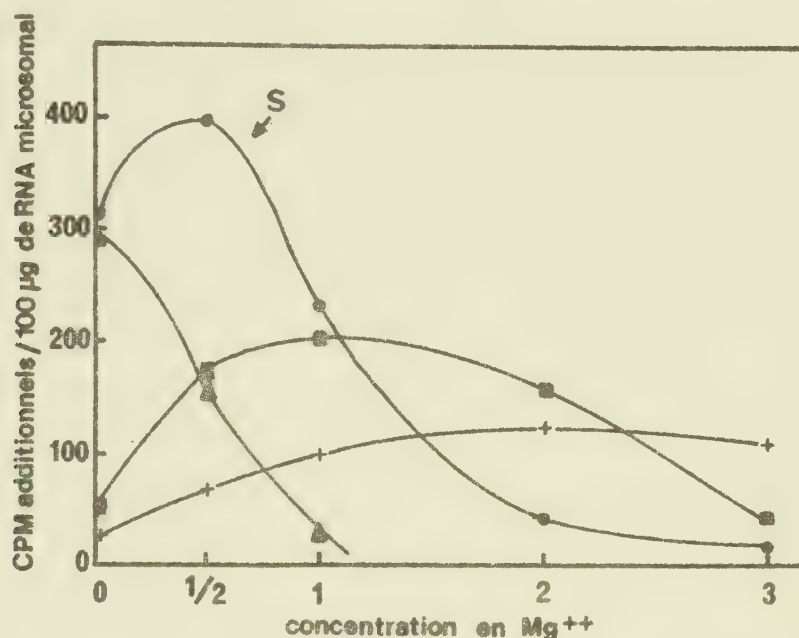


Fig. 47 - Incorporation additionnelle de ^{14}C -phénylalanine en présence de $100 \mu g/ml$ de RNA naturel (RNA nucléaire, extraction SCHERRER) en fonction de la concentration en ions Mg^{++} et pour différentes concentrations en énergie. (ATP, GTP, PEP, PK).

$Mg0$ - concentration standard ($5,6 \mu M/ml$)

$Mg_{1/2}$ - addition de $2,8 \mu M/ml$

$Mg1$ - addition de $5,6 \mu M/ml$

$Mg2$ - addition de $11,2 \mu M/ml$

$Mg3$ - addition de $16,8 \mu M/ml$

E1 - concentration standard en énergie ●—●

E2 - concentration double en énergie ■—■

E3 - concentration triple en énergie +—+

E1/2 - concentration moitié en énergie ▲—▲

- Stimulation en fonction de la durée de préincubation.

Dans ces expériences, nous avons mesuré simultanément l'incorporation due au mRNA endogène et la stimulation par un mRNA naturel.

Il ressort de l'examen de la figure 48, que la stimulation par le RNA se fait selon un mécanisme tout à fait différent de celui de la stimulation par le poly U (chapitre VI, paragraphe 3 d, figure 28). Au fur et à mesure de l'augmentation du temps de préincubation, la stimulation additionnelle par le mRNA naturel diminue pour s'annuler pratiquement après 10 min. de préincubation des microsomes. Il semble donc que la préincubation entraîne la destruction de certains facteurs nécessaires à la fixation ou à la traduction du mRNA naturel. Nous avons par ailleurs vérifié que ces facteurs éventuels ne se trouvent pas dans le surnageant 105.000 g, car l'addition de surnageant frais après la préincubation ne favorise pas la stimulation.

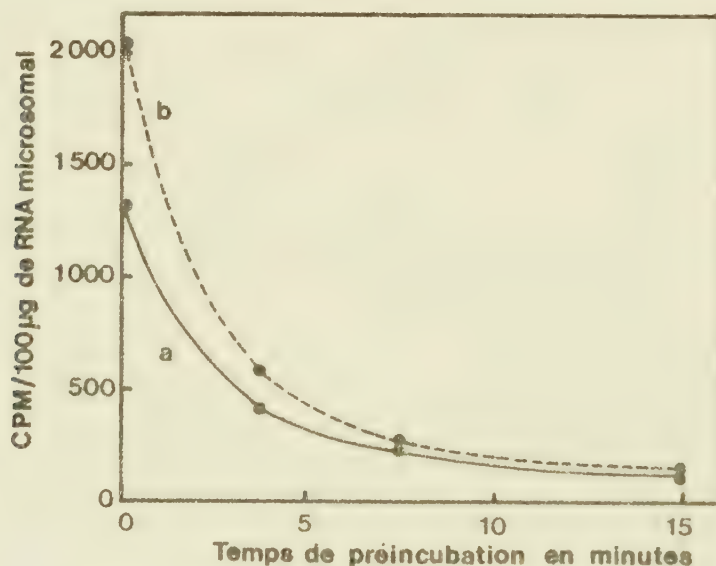


Fig. 48 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine dans les protéines en fonction du temps de préincubation :

- a. - en absence de RNA naturel
- b. - en présence de 100 µg/ml de RNA naturel (RNA nucléaire, extraction SCHERRER).

Il se pourrait que la stimulation par les mRNA naturels soit empêchée par la destruction rapide au cours de la préincubation, de facteurs d'initiation du type de ceux mis en évidence par REVEL et GROS (1966).

2. Activité des autres systèmes acellulaires.

Nous comparerons ici, par rapport au système microsomal que nous venons d'étudier, l'activité d'incorporation des aminoacides des autres systèmes : l'un moins purifié et plus facile à préparer, le système acellulaire brut "S 20" ; les autres plus purifiés mais de préparation plus laborieuse, le système "ribosomal" et le système "polysomal", tous deux caractérisés par l'absence des membranes du reticulum endoplasmique.

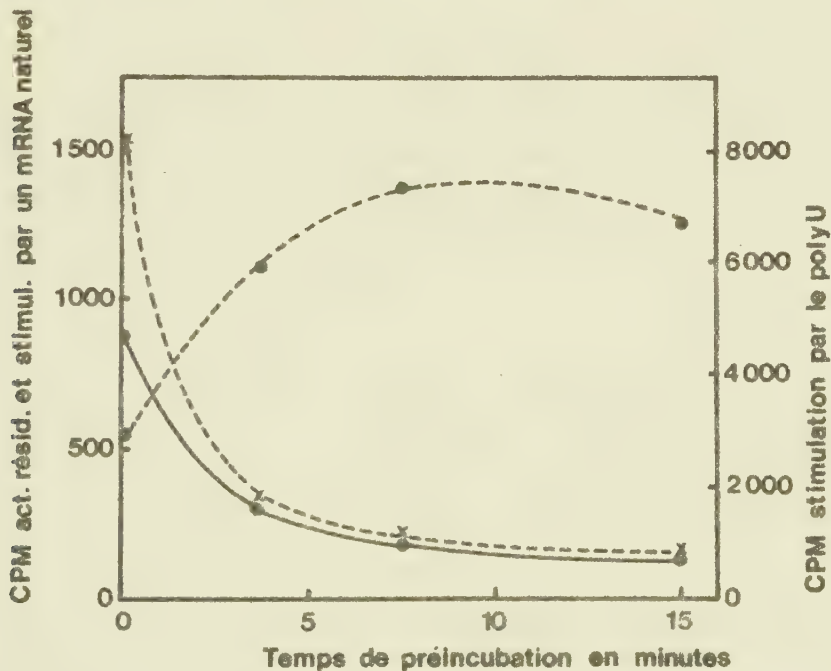


Fig. 49 - Fonctionnement du système acellulaire "S-20". Incorporation de ^{14}C -phénylalanine en fonction du temps de préincubation (CPM p. 100 μg de RNA microsomal).

- Activité résiduelle
 - x-----x Stimulation par un RNA naturel (RNA nucléaire, extraction SCHERRER)
 - Stimulation par le polyU
- (Au temps 0, correspondent les activités du système non préincubé.)

a) Activité du système acellulaire brut "S 20"

L'activité, ramenée à la même quantité de RNA microsomal, est en général légèrement inférieure à celle observée dans le système microsomal. Ceci pourrait provenir d'un certain déséquilibre entre la quantité de microsomes et la quantité de protéines enzymatiques (voir figure 23), ce rapport étant difficile à ajuster aux conditions optimales. Les cinétiques d'incorporation de ce système sont voisines de celles du système microsomal; la vitesse de synthèse est un peu plus grande et le maximum d'incorporation des aminoacides est atteint après 20 min. d'incubation. Pour tout le reste, le fonctionnement est analogue à celui du système microsomal, notamment en ce qui concerne la pré-incubation, la stimulation par le poly U et la stimulation additionnelle par les mRNA naturels (figure 49).

Ce système présente donc des caractéristiques de fonctionnement satisfaisantes et l'avantage d'une préparation simple et rapide. Mais il présente l'inconvénient de ne pas permettre des études croisées entre les microsomes et les fractions enzymatiques de foies provenant de divers lots d'animaux physiologiquement différents.

b) Activités des systèmes "ribosomal" et "polysomal"

Dans le système "ribosomal" de type KORNER (1961) non préincubé, les taux de ^{14}C -phénylalanine et de ^{14}C -leucine incorporés sont analogues ou légèrement inférieurs à ceux observés dans le système microsomal. Cependant, pour ce système le maximum d'incorporation des aminoacides dans les protéines n'est atteint qu'à partir d'une incubation de 45 min. En ce qui concerne l'activité du système "ribosomal" préincubé, on constate que cette dernière est également semblable à celle du système microsomal préincubé. Toutefois, l'épuisement du RNA messenger endogène n'est atteint que pour une durée de préincubation de l'ordre de 30 min., au lieu de 15 min.

Quelques expériences effectuées sur les polysomes libres, de type BLOEMENDAL (1967) montrent que l'activité de ces derniers n'est pas supérieure à celle des ribosomes de type KORNER ou à celle des microsomes.

Si ces deux systèmes peuvent présenter un intérêt pour des études de nature biochimique, ils ne présentent pas d'avantage par rapport au système microsomal en ce qui concerne les études de nature physiologique et d'actions hormonales qui entrent dans nos préoccupations.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le système acellulaire microsomal que nous venons de décrire présente plusieurs avantages :

- 1°) La préparation est rapide puisqu'elle se limite à l'utilisation des microsomes et du surnageant total 105.000 g. Elle est aisément reproductible.
- 2°) Le système utilisé tel quel permet une forte incorporation des aminoacides dûe au RNA messager endogène.
- 3°) Après inactivation de ce dernier par préincubation, le système permet de plus, et de manière reproductible, une forte incorporation de phénylalanine en présence de poly U.
- 4°) Il permet de faire des expériences croisées entre les microsomes et les préparations enzymatiques pour localiser éventuellement une action hormonale au niveau de l'une ou de l'autre de ces fractions subcellulaires.

Ces caractéristiques permettent ainsi de connaître pour le même système, son activité propre (dûe aux RNA messagers endogènes) et, après préincubation, sa capacité de répondre à un RNA messenger exogène synthétique tel que le poly U.

L'étude des conditions optimales d'activité du système microsomal a montré qu'il était nécessaire, pour obtenir des résultats reproductibles, de se placer dans des conditions étroitement définies de concentrations en microsomes, en surnageant 105.000 g, en ions Mg^{++} et K^+ et en précurseurs générateurs d'énergie. On peut alors exprimer les résultats en CPM/100 μg de RNA microsomal et comparer entre elles les valeurs déterminées dans les différentes expériences (tableau V et VI). Il est par ailleurs important de se placer dans la zone optimale de pH entre 6,8 et 7,2

(figure 30). On peut remarquer que ce pH optimum se place loin de celui employé généralement par les autres auteurs (pH 7,6 - 7,8). Or, nous constatons que l'activité du système décroît rapidement au-dessus d'un pH de 7,2.

Une caractéristique des systèmes que nous venons d'étudier est de présenter après préincubation, une excellente capacité d'incorporation de la phénylalanine en présence de poly U. Ce résultat diffère de ceux obtenus par MAXWELL (1962) et HISHIZAWA et coll. (1964) avec un système microsomal et par STAEHELIN (1965) avec un système ribosomal de foie de rat : ces auteurs n'ont plus observé de stimulation de l'incorporation des aminoacides en présence de poly U, après préincubation de leur système. Par contre, KATO et coll. (1965) ont décrit un système microsomal et ribosomal de foie de rat répondant à l'addition de poly U après préincubation. Le résultat positif de ces auteurs pourrait s'expliquer par l'addition, après préincubation, d'une nouvelle quantité de système générateur d'ATP. Cependant, HISHIZAWA et coll. (1964) n'avaient pas réussi la réactivation après préincubation, malgré l'apport d'une nouvelle quantité d'ATP et de système générateur. Nous avons de notre côté constaté qu'un nouvel apport énergétique était nécessaire, mais qu'il ne devait cependant pas être excessif car une quantité trop importante de système générateur d'ATP inhibe la stimulation par le poly U (figure 37). Cette inhibition n'est que partiellement levée par une addition d'ions Mg^{++} . La complexation du Mg^{++} par l'ATP en excès n'est donc pas seule en cause.

La stimulation de l'incorporation de la phénylalanine en présence de poly U après préincubation est nettement supérieure aux valeurs obtenues par d'autres auteurs avec des systèmes acellulaires de foie de rat. En effet, les facteurs de stimulation donnés par ces auteurs (MAXWELL, 1962 ; KORNER et MUNRO, 1963 ; HENSHAW et coll., 1963 ; CAMPBELL et coll., 1964 ; KORNER et GUMBLEY, 1966) sont de l'ordre de 4 à 24, alors que dans notre cas, ils se situent entre 40 et 100 (en moyenne 60). Les facteurs de stimulation que nous avons trouvés dépassent même les meilleurs rapports décrits dans la littérature et obtenus avec des systèmes acellulaires d'origine tumorale (WEINSTEIN et SCHECHTER, 1962 ; GRIFFIN et coll., 1965 ; WILKINSON et KIRBY, 1966). Récemment, WEKSLER et GELBOIN (1967) en utilisant des microsomes, PARTHIER (1967), en utilisant des

ribosomes de foie de rat dans des conditions techniques différentes ont obtenu après préincubation des stimulations du même ordre de grandeur que dans nos expériences.

Malgré les bonnes capacités de biosynthèse protéique in vitro de ces systèmes acellulaires, en présence de poly U ou des RNA messagers endogènes, il subsiste cependant le problème de l'absence de stimulation de cette synthèse par les mRNA naturels exogènes, qui jusqu'à présent n'a pas reçu, à notre connaissance, de solution. L'obtention d'une néosynthèse de protéines après préincubation sous l'influence d'un mRNA extrait d'un tissu préalablement stimulé par une action hormonale permettrait de vérifier si les protéines ainsi synthétisées sont spécifiques de cette action hormonale et permettrait simultanément de localiser cette action au niveau de la régulation des messages du code génétique.

Pour le moment, ces méthodes peuvent donc être appliquées uniquement sous l'angle des activités de synthèse protéique dûes au messenger endogène. Une telle étude de l'influence de l'hypophysectomie et de l'hormone de croissance (STH) sur la synthèse protéique dans le foie de rat, sera décrite au chapitre suivant.

CHAPITRE VIII

COMPARAISON

DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DANS LE SYSTÈME MICROSOMAL DE FOIE DE RATS NORMAUX, HYPOPHYSECTOMISÉS, ET TRAI- TÉS À L'HORMONE DE CROISSANCE

Le conditionnement des animaux utilisés pour ces expériences a été décrit page 7. En ce qui concerne les rats hypophysectomisés ou traités à l'hormone somatotrope après ablation de l'hypophyse, nous avons suivi journalièrement l'évolution du poids de ces animaux, et, au moment de l'expérience, nous avons procédé à l'autopsie du cerveau et des glandes génitales pour contrôler l'efficacité de l'hypophysectomie. De plus, des prélèvements de petits fragments hépatiques ont été effectués pour le contrôle microscopique. Des coupes semi-fines colorées au P.A.S. et au bleu de toluidine ont été examinées au microscope optique et des coupes ultra-fines colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb ont été examinées au microscope électronique (SIEMENS Elmiskop I).

1. Aspect cytologique ultrastructural des foies et des préparations microsomales

a) Etude cytologique des foies

Dans l'hépatocyte normal (Planche IV a), les citernes ergastoplasmiques sont distribuées en amas séparés par des plages de glycogène. Entre les citernes, on observe des ribosomes libres disposés en rosettes ou en chaînettes. Les mitochondries, volumineuses et denses, se répartissent dans les zones ergastoplasmiques. Le glycogène est abondant.

Dans les cellules de foie provenant d'animaux hypophysectomisés, les citernes tendent à se dégranuler et à se fragmenter à leur extrémité. Il se forme des amas de vésicules à paroi lisse, plus ou moins anastomosées. On observe une raréfaction des ribosomes libres ainsi que du glycogène. On note la persistance de quelques formations ergastoplasmiques marginales (planche IV b).

Après le traitement des animaux hypophysectomisés à l'hormone somatotrope, on observe dans l'hépatocyte une prolifération de petites citernes ergastoplasmiques qui se développent en association étroite avec les mitochondries. En même temps que se développent les structures ergastoplasmiques, apparaissent de nombreux ribosomes libres. Le glycogène redevient abondant. (Planche V).

b) Aspect des préparations microsomales

L'examen des coupes ultra-fines effectuées à partir de culots de microsomes obtenus par centrifugation à 105.000 g, montre que les préparations sont constituées de vésicules et de ribosomes. Il existe toujours une certaine hétérogénéité dans la proportion relative entre membranes lisses et granulees, ribosomes fixés et ribosomes libres, selon les régions examinées. L'appréciation rigoureuse et quantitative est difficile et nous ne donnerons que l'impression se dégageant de nombreux clichés.

Dans les culots provenant de foies normaux, les vésicules sont généralement plus ou moins granulees, garnies de ribosomes. Les vésicules lisses sont relativement rares et les ribosomes libres sont relativement peu abondants. (Planche VI a).

Dans les culots provenant de foies d'animaux hypophysectomisés, les vésicules lisses sont abondantes et on observe plus fréquemment des amas de ribosomes libres (planche VI b). L'augmentation des ribosomes libres ne doit pas cependant être interprétée comme résultant de leur détachement des membranes ergastoplasmiques sous l'effet de l'hypophysectomie. Lorsque les citernes ergastoplasmiques de la cellule hépatique se dégranulent, les ribosomes paraissent subir une

véritable fonte ; ils ne s'accumulent pas dans l'hyaloplasme. Le fait que les ribosomes libres soient plus abondants dans les fractions microsomales de l'animal hypophysectomisé pourrait correspondre à une modification des rapports entre ribosomes et membranes entraînant une association plus fragile des deux constituants.

L'analyse des microsomes en gradient de concentration de saccharose, dans les conditions indiquées dans la figure 50, confirme l'impression de l'augmentation des ribosomes libres dans les préparations provenant de foies d'animaux hypophysectomisés. En effet, on constate que le pic correspondant aux ribosomes libres non liés aux vésicules est beaucoup plus important dans le cas des préparations microsomales de rats hypophysectomisés que dans celui de rats normaux.

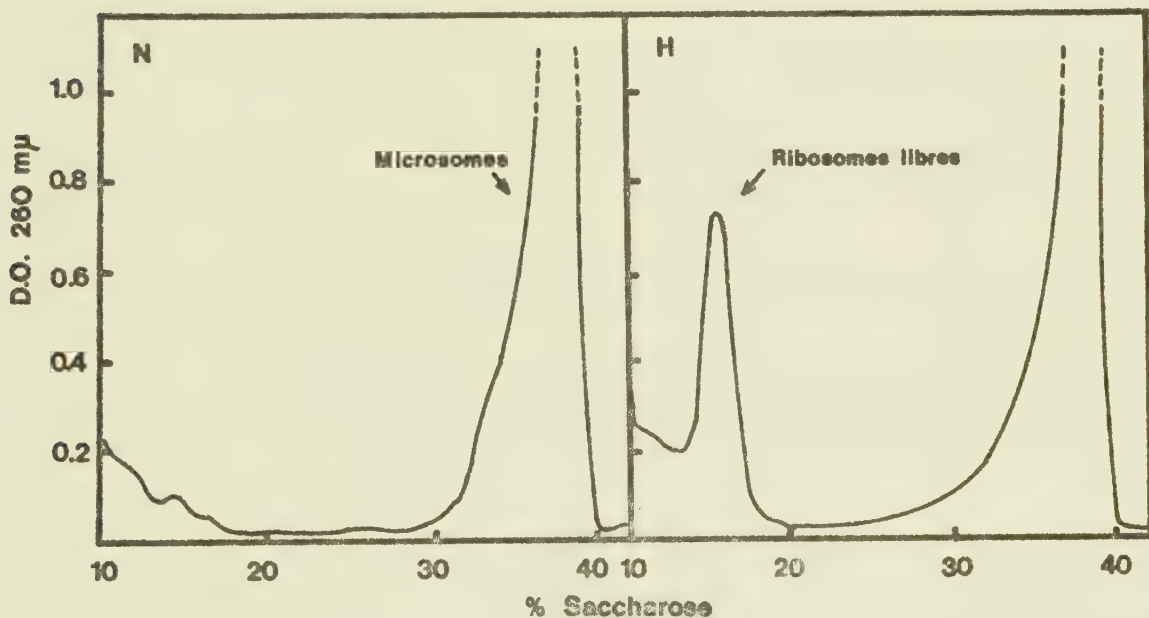


Fig. 50 - Profils de sédimentation en gradient de concentration de saccharose de 10 à 40%, des microsomes de foie de rats normaux (N) et de rats hypophysectomisés (H). (Centrifugation pendant 2h à 20.000 t/min., rotor Spinco SW-25.1. (Avant de faire le gradient, on place préalablement 2 ml de solution de saccharose à 55% dans le fond des tubes de centrifugation).

2. Activité du système microsomal de foie de rats hypophysectomisés et traités à l'hormone de croissance

Les conditions de préparation et d'incubation du système microsomal à partir de foies de rats hypophysectomisés et hypophysectomisés puis traités à l'hormone de croissance, sont les mêmes que les conditions standard décrites au chapitre VI, paragraphes 1 et 2.

On compare dans la même expérience la quantité de ^{14}C -phénylalanine incorporée dans les protéines sous l'effet du mRNA endogène (activité propre) et en présence de poly U (activité additionnelle) dans les systèmes microsomaux provenant de foie de rats de même âge normaux, hypophysectomisés et hypophysectomisés puis traités à l'hormone de croissance.

Nous désignerons par :

M_N et S_N , les microsomes et le surnageant 105.000 g provenant de foie de rats normaux,

M_H et S_H , les microsomes et le surnageant 105.000 g provenant de foie de rats hypophysectomisés,

M_C et S_C , les microsomes et le surnageant 105.000 g provenant de foie de rats hypophysectomisés et traités à l'hormone de croissance.

$M_N S_N$ désignera par exemple le système acellulaire complet de foie de rats normaux. Nous comparerons ainsi les activités d'incorporation des systèmes homologues $M_N S_N$, $M_H S_H$ et $M_C S_C$, et des systèmes hétérologues $M_N S_H$ et $M_H S_N$, en absence et en présence de poly U.

a) Activité propre des systèmes non préincubés

Les activités d'incorporation de la ^{14}C -phénylalanine dans les protéines sont représentées dans la figure 51. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne des incorporations de 4 expériences.

La comparaison des activités propres des différents systèmes montre que l'hypophysectomie entraîne une diminution importante (65 p. 100) de l'incorporation de la ^{14}C -phénylalanine dans les protéines. L'administration d'hormone de croissance aux rats hypophysectomisés restaure partiellement l'activité d'incorporation, mais sans jamais atteindre celle du système microsomal $\text{M}_{\text{N}}\text{S}_{\text{N}}$. Ce résultat peut s'expliquer car l'hypophysectomie entraîne la suppression d'autres hormones et on sait qu'in vivo, l'hormone somatotrope purifiée ne peut à elle seule rétablir intégralement les synthèses protéiques. (WAGLE, 1963 ; TATA, 1967).

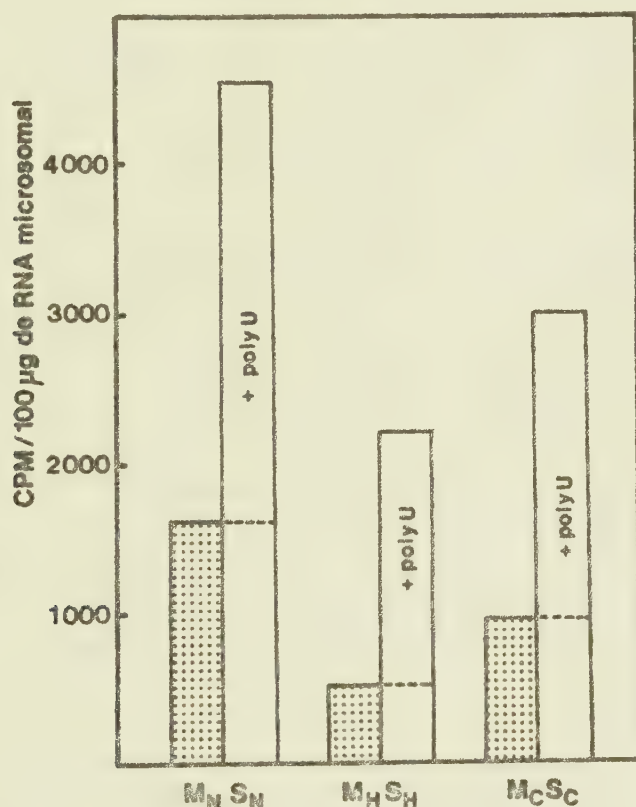
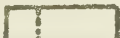


Fig. 51 - Incorporation de ^{14}C -phénylalanine dans les protéines des systèmes acellulaires provenant de foies de rats normaux, hypophysectomisés, traités à l'hormone de croissance.

Activité propre 

Stimulation additionnelle par le polyU 

b) Activité additionnelle des systèmes non pré-incubés en présence de poly U

L'incorporation de phénylalanine dans les protéines en présence de poly U est nettement plus faible dans le système provenant d'animaux hypophysectomisés (figure 51 et tableau XI). Dans le système $M_C S_C$, l'incorporation est plus grande que pour $M_H S_H$, mais ne rejoint pas celle obtenue dans le système $M_N S_N$. Comme pour l'activité propre, l'hormone somatotrope ne peut à elle seule restaurer totalement la stimulation de l'incorporation par le poly U.

Si on compare le facteur de stimulation, il est légèrement plus élevé pour $M_H S_H$ que pour $M_N S_N$. Un résultat analogue a été trouvé par KORNER (1965) et par STAEHELIN (1965) qui ont émis l'hypothèse que la diminution de l'activité endogène serait due à une déficience en RNA messenger ; par là, la proportion des ribosomes libres augmentant, la stimulation par le poly U devient plus grande. Mais si cette interprétation était exacte, la valeur absolue de l'incorporation de phénylalanine en présence de poly U devrait être identique, sinon supérieure dans le système $M_H S_H$ par rapport à $M_N S_N$. Or, ceci n'est pas le cas ; l'augmentation en valeur absolue de l'incorporation (CPM pour 100 μ g de RNA en présence de poly U moins CPM pour 100 μ g de RNA en absence de poly U) reste nettement inférieure pour $M_H S_H$ (tableau XI, 3ème ligne). Il faut donc envisager l'intervention d'un autre facteur que le taux de RNA messenger, c'est-à-dire des modifications soit au niveau des microsomes, soit au niveau des enzymes ou des t-RNA du surnageant 105.000 g. Les expériences récentes de GARREN et coll. (1967) sont également en faveur d'une telle interprétation suggérant que les microsomes des animaux hypophysectomisés sont moins actifs dans la traduction d'un RNA messenger.

c) Activité des systèmes à composition croisée

Les résultats d'une expérience caractéristique de ce type sont consignés dans le tableau XI.

T A B L E A U X I

Activité propre et stimulation de l'incorporation
de ^{14}C -phénylalanine par le poly U en systèmes croisés

Conditions d'incubation	Systèmes complets			
	M_N S_N	M_N S_H	M_H S_N	M_H S_H
Incubation directe Activité propre	1690	1463	989	788
Incubation en présence de 250 μg de Poly U	5825	4448	4793	3092
Augmentation en CPM/100 μg de RNA	4135	2985	3804	2304
Facteur de stimulation	3,4	3,0	4,8	3,9

On constate qu'en présence de surnageants identiques, les microsomes des rats hypophysectomisés incorporent moins de phénylalanine, à quantité de RNA microsomal équivalente, que les microsomes de rats normaux (comparaison entre $M_N S_N$ et $M_H S_N$ et comparaison entre $M_H S_H$ et $M_N S_H$).

En présence de microsomes identiques, le surnageant 105.000 g provenant d'animaux hypophysectomisés, ne permet pas, à quantité équivalente de protéines, une aussi forte réponse au poly U (comparaison entre $M_N S_N$ et $M_N S_H$ et comparaison entre $M_H S_N$ et $M_H S_H$).

Il apparaît donc que la diminution de la stimulation par le poly U résulte également d'une action inhibitrice au niveau du surnageant 105.000 g des animaux hypophysectomisés (tableau XI, 3ème ligne, colonnes 2 et 4) et il semble que cette action soit plus importante à ce niveau qu'à celui des microsomes.

3. Conclusions

Ces résultats n'excluent pas l'hypothèse d'une action de régulation de l'hormone somatotrope au niveau de la transcription du DNA en RNA messager. Mais ils montrent aussi que l'ablation de l'hypophyse entraîne (du moins après un laps de temps de 40 jours) une altération au niveau des membranes, des ribosomes et de la partie soluble du cytoplasme.

L'altération au niveau des microsomes pourrait provenir d'un changement au niveau de la fixation du RNA messager aux ribosomes, c'est-à-dire d'une certaine instabilité des polysomes. Cette hypothèse a également été avancée par KORNER et GUMBLEY (1966) et elle est en accord avec les travaux de STAEHELIN (1965) sur les polysomes.

L'altération au niveau des surnageants 105.000 g, clairement mise en évidence par les études avec le poly U, pourrait provenir d'un effet au niveau des enzymes d'activation et des facteurs de transfert : diminution du taux de ces enzymes ou facteurs, ou altération conduisant à leur inactivation partielle. Mais la diminution d'activité pourrait aussi provenir de modifications dans les tRNA. Nous avons commencé des recherches dans ce sens qui seront décrites dans la 2ème partie de ce travail.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES SUR LES RNA DE TRANSFERT DE FOIE DE RATS NORMAUX ET HYPOPHYSECTOMISES

INTRODUCTION

Le problème du contrôle hormonal de la synthèse des protéines peut être envisagé non seulement sous l'angle des RNA messagers, mais aussi sous l'angle des RNA de transfert. Lorsque le foie se met à produire une nouvelle famille de protéines ou si au contraire quelque protéine cesse d'être synthétisée, la proportion de certains tRNA par rapport à d'autres est-elle modifiée ? Si oui, le tRNA pourrait-il avoir un rôle régulateur dans la synthèse des protéines chez les mammifères.

Il est bien connu à l'heure actuelle que chaque aminoacide est activé au cours de la synthèse protéique par un tRNA spécifique. DOCTOR et coll. (1961) ont été les premiers à montrer l'existence de plusieurs formes de tRNA pour la leucine et pour la thréonine lors du fractionnement des tRNA de levure par la méthode du contre-courant. Des travaux récents effectués à partir de microorganismes, en particulier *E. coli* (APGAR et HOLLEY, 1964 ; GOLDSTEIN et coll., 1964 ; SUEOKA et KANO-SUEOKA, 1964 ; KELMERS et coll., 1965 ; GARTLAND et SUEOKA, 1966 ; MUENCH et BERG, 1966 a et b ; WATERS et NOVELLI, 1967 ; LINDAHL et coll., 1966, 1967), *B. subtilis* (KANEKO et DOI, 1966) et la levure (THIEBE et ZACHAU, 1965 ; CHERAYIL et BOCK, 1965 ; DIRHEIMER et EBEL, 1967), mettent en évidence la multiplicité des tRNA spécifiques d'un même aminoacide et ceci par des techniques de fractionnement très diverses. Certaines expériences semblent indiquer que l'existence des différentes formes de RNA de transfert est en relation, chez les microorganismes, avec les mécanismes de régulation cellulaire (pour une revue de la question voir NOVELLI, 1967). Il s'agit en particulier des expé-

riences réalisées au cours des cytodifférenciations induites chez *E. coli* lors de l'infection par le phage T₂ (SUEOKA et KANO-SUEOKA, 1964 ; WATERS et NOVELLI, 1967) et au moment de la sporulation chez *B. subtilis* (KANEKO et DOI, 1966, HEYMAN et coll. , 1968).

Les travaux concernant l'hétérogénéité des tRNA chez les organismes supérieurs et en particulier chez les mammifères sont récents et peu nombreux. APGAR et HOLLEY (1962) et GLEBOV et coll. (1965) ont montré que les tRNA de foie de mammifères présentent un degré d'hétérogénéité supérieur à celui rencontré chez les organismes inférieurs. YANG et NOVELLI (1968) ont fait une constatation analogue lors de la chromatographie en phase inversée des différents tRNA isolés à partir de cellules tumorales de plasma de souris. D'après ces auteurs l'existence des multiples formes de tRNA spécifiques d'un même aminoacide serait le reflet de la multiplicité des "codons synonymes". TAYLOR et coll. (1967) ont recherché les similitudes et les différences parmi les tRNA spécifiques isolés à partir de tissus de mammifères d'origine très diverse en comparant les profils chromatographiques des aminoacyl-tRNA (obtenus par double marquage au ¹⁴C et au ³H) sur colonne d'albumine méthylée. Quoique cette étude ait été effectuée avec dix aminoacides seulement et que le pouvoir de résolution de la technique chromatographique employée soit limité, ces auteurs ont observé des différences nettes entre les profils d'élution correspondant aux phénylalaninyl, séryl et tyrosinyl-tRNA des cellules tumorales d'ascites d'EHRlich et des tissus normaux chez la souris. Enfin, YANG et COMB (1968), en étudiant la répartition par chromatographie sur colonne d'albumine méthylée des différentes formes du lysinyl-tRNA isolé à partir de diverses fractions cellulaires dans le cas des oeufs d'oursins, ont observé d'importants changements dans cette répartition pendant les premiers stades consécutifs à la fécondation, ces changements pouvant être en relation avec la régulation de la synthèse protéique au niveau de la traduction pendant l'embryogénèse. De même, LEE et INGRAM (1967) ont observé des différences qualitatives et quantitatives des méthioninyl-tRNA durant le développement du poussin ; ces variations conduiraient à une altération de la capacité de fonctionnement des tRNA et de ce fait affecteraient la traduction.

De notre côté, nous avons envisagé d'étudier la répartition des RNA de transfert isolés à partir de foie de rat. Pour fractionner le mélange de tRNA, nous avons appliqué la méthode de chromatographie en phase inversée récemment décrite par WEISS et KELMERS (1967) qui possède vis à vis des divers tRNA un pouvoir de résolution élevé. Dans le but de rechercher si une modification hormonale pouvait se traduire par un changement au niveau de la répartition des tRNA, nous avons étudié et comparé les tRNA de foie de rat provenant d'animaux normaux et d'animaux hypophysectomisés.

Le présent travail n'est qu'une approche à ce problème. En effet, avant d'aborder l'étude de la répartition des différents tRNA spécifiques d'un même aminoacide, nous avons été amené tout d'abord à utiliser ou à mettre au point différentes techniques d'extraction et de purification des acides ribonucléiques de transfert. Après avoir préparé à partir de foie de rat des tRNA hautement purifiés et un extrait enzymatique contenant les aminoacyl-tRNA synthétases, nous avons étudié les conditions optimales de fixation des tRNA vis à vis des différents aminoacides. Cette étude nous a permis de comparer la capacité acceptrice des tRNA extraits à partir de foie de rats normaux et de foie de rats hypophysectomisés. Enfin, les tRNA chargés les uns avec l'acide aminé marqué au ^3H (tRNA provenant de foie d'animaux normaux) et les autres avec l'acide aminé marqué au ^{14}C (tRNA provenant de foie d'animaux hypophysectomisés) ont été comparés par chromatographie du mélange des deux catégories d'acide aminoacyl-tRNA sur une même colonne de Chromosorb.

A. ESSAI DE MISE EN EVIDENCE DE DIFFERENCES AU NIVEAU DES
tRNA

CHAPITRE IX

PREPARATION ET ANALYSE DES RNA DE TRANSFERT
DE FOIE DE RAT

1. Préparation des acides ribonucléiques de transfert

Les foies sont prélevés et lavés rapidement dans une solution de NaCl 9 p.1000. Le RNA peut être extrait immédiatement. Il est également possible de conserver les foies sous forme congelée à - 20° en les refroidissant brusquement dans la carboglace, ce qui permet d'accumuler une quantité importante de tissus pendant plusieurs semaines sans entraîner de changement dans la qualité et le rendement des tRNA ultérieurement extraits. Dans ces conditions, les foies sont décongelés dans la solution de broyage au moment de l'extraction du RNA.

Nous avons utilisé trois méthodes de préparation des tRNA. Pour les deux premières, la mise au point résulte d'une étude personnelle d'adaptation des techniques décrites pour les tRNA de bactéries. La troisième a été décrite par DELIHAS et STAEHELIN (1966).

a) Préparation par action du phénol à froid, à
partir du surnageant 105.000 g

Les foies sont découpés en petits morceaux et broyés dans la solution A' définie page 71 et contenant 100 µg de PVS/ml. On prépare un homogénat à 25 p. 100 par broyage dans un homogénéiseur de Potter dans lequel on réalise 5 passages avec le piston lâche (jeu de 1 mm), puis 10 passages avec le piston serré (jeu de 0,12 mm) ; le broyat est filtré

sur 4 couches de gaze. Les noyaux et les débris cellulaires sont écartés par une centrifugation de 8 min. à 800 g. Une nouvelle centrifugation de 15 minutes à 20.000 g permet d'éliminer les mitochondries. Enfin, le surnageant postmitochondrial est centrifugé dans le rotor 30 d'une ultracentrifugeuse préparative Spinco à 105.000 g durant 2 h afin d'écarter les microsomes.

Le surnageant 105.000 g contenant le sRNA et les enzymes est soumis à trois extractions successives par le phénol saturé par le tampon Tris-HCl 0,01 M à pH 7,2 0,01 M en acétate de Mg^{++} et contenant 0,3 p. 100 de SDS. Au moment de l'emploi, le phénol saturé est additionné de 0,1 p. 100 de 8-hydroxyquinoléine. Une première extraction est effectuée par 1,5 volumes de phénol. Le mélange est agité pendant 30 minutes à 4° puis centrifugé pendant 5 min. à 3.000 g. Le surnageant est prélevé par succion et soumis à une 2ème extraction par 1 volume de phénol puis à une 3ème extraction par 1/2 volume de phénol saturé, les durées d'agitation étant de 15 minutes chaque fois. Finalement, le surnageant est prélevé, additionné de 2 g pour 100 d'acétate de potassium, puis de 2 volumes d'éthanol préalablement refroidi à - 20°. On laisse la précipitation du RNA se compléter à - 20° durant 2 heures au minimum. Le précipité est récupéré par centrifugation, mis en solution dans du NaCl $10^{-3}M$ contenant 50 $\mu g/ml$ de PVS. On procède à une deuxième précipitation dans les conditions précédentes, cette dernière ayant pour but d'éliminer les oligonucléotides et les nucléotides qui ont coprécipité avec le sRNA d'une part et les traces de phénol d'autre part.

b) Préparation par action du phénol à froid, à partir du surnageant cytoplasmique

Après élimination des noyaux, le surnageant est soumis à 3 extractions phénoliques suivies de 2 précipitations par l'éthanol dans les conditions précédemment décrites pour l'extraction du sRNA à partir du surnageant 105.000 g. Dans ce cas, on extrait simultanément le RNA soluble et le RNA ribosomal. Ce dernier est éliminé sous forme de précipité, après action du NaCl 2 M en présence de PVS (50 $\mu g/ml$) durant 16 h à 4°, par une centrifugation de 10 minutes à 4.000g. Dans ce cas, on obtient à la fois le tRNA libre et le tRNA qui était initialement lié aux microsomes.

c) Préparation par action du phénol à froid, puis à chaud à partir d'un broyat cellulaire

Cette technique a été mise au point par DELIHAS et STAEHELIN (1966). Une première extraction est effectuée par le phénol à froid, les trois extractions suivantes sont réalisées par le phénol et le dodécylsulfate de sodium à chaud selon la technique de SCHERRER et DARNELL (1962). Le sRNA obtenu par précipitation au NaCl 1 M est chromatographié sur une colonne de Sephadex G 200 selon la méthode décrite par DIRHEIMER et coll. (1962) qui permet d'éliminer les contaminations par le DNA et par le RNA ribosomal.

d) Purification des préparations de sRNA

(α) Traitement au méthylcellosolve (éther monométhylque de l'éthylène glycol).

Ce traitement a été préconisé par KIRBY (1956) pour éliminer les polysaccharides contaminants.

Le précipité de sRNA est redissous dans l'eau à raison de 1 à 2 mg/ml. A 1 volume de la solution de sRNA, on ajoute 1 volume de méthylcellosolve, 1 volume d'une solution de K_2HPO_4 2,5 M et 0,05 volume de H_3PO_4 à 33 p. 100. Le mélange obtenu est agité dans une ampoule à décantation pendant 5 min. puis centrifugé pour accélérer la séparation des 2 phases. La phase supérieure est prélevée et conservée à 4°. Pour récupérer le sRNA restant dans la phase inférieure, cette dernière est traitée par 0,5 volume d'une solution composée de la phase supérieure obtenue en agitant et en laissant décanter le mélange suivant : 1 volume d'eau, 1 volume de méthylcellosolve, 1 volume d'une solution de K_2HPO_4 2,5 M et 0,05 volume de H_3PO_4 à 33 p. 100. Après agitation, on centrifuge et on prélève la phase supérieure que l'on ajoute à celle qui a été recueillie précédemment. La solution ainsi obtenue est additionnée de 0,1 volume d'acétate de potassium à 20 p. 100 et le sRNA est précipité par 2 volumes d'éthanol froid. On laisse la précipitation se parfaire pendant 2 h au minimum à - 20°, puis on centrifuge et on redissout le précipité dans le tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 7,5.

(β) Traitement par un sel d'ammonium quaternaire.

Cette méthode décrite par AUBEL-SADRON et coll. (1961) permet également d'éliminer les polysaccharides contaminant les préparations de RNA. Elle consiste à effectuer la précipitation du sRNA par un sel d'ammonium quaternaire, le bromure de triméthyl-hexadécyl-ammonium et à solubiliser les précipités dans un solvant organique (l'éthanol ou le diméthylformamide). Les polysaccharides insolubles sont écartés par centrifugation. Les acides nucléiques sont ensuite régénérés sous forme de sels de sodium à partir de la solution organique par addition de NaCl. Après centrifugation, le précipité de sRNA est lavé avec le mélange éthanol - NaCl 0,1 M (80 : 20, v/v) et redissous dans le tampon Tris-HCl 0,1 M pH 7,5.

(γ) Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose.

Le passage sur DEAE-cellulose a été préconisé par HOLLEY et coll. (1961) pour éliminer les oligonucléotides et les contaminations éventuelles par du RNA ou du DNA de haut poids moléculaire.

La DEAE-cellulose (SERVA) est préalablement traitée pendant 30 min. par NaOH N, lavée à l'eau jusqu'à neutralité des eaux de lavage, puis équilibrée avec le tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 7,5. La suspension est placée dans une colonne de 13 cm de haut sur 2 cm de diamètre. Le sRNA dissous dans le minimum de tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 7,5 (8 à 15 ml) est versé sur la colonne ; on veille à ce que le débit soit de 8 à 10 gouttes par min. pour que l'absorption du sRNA puisse se faire convenablement. On lave ensuite avec 2 à 3 volumes de tampon Tris-HCl 0,1 M, puis on élue le sRNA avec 2 volumes d'une solution de Tris-HCl 0,1 M, NaCl 1 M à pH 7,5. L'éluat est traité par 3 volumes d'éthanol préalablement refroidi à - 20° et on laisse le précipité de sRNA se former pendant 12 à 16 heures.

(δ) Détachement des aminoacides.

Pour éliminer les aminoacides encore estérifiés sur les tRNA, le précipité est traité pendant 90 min. à 37° par du Tris-HCl 1,8 M à pH 8 (SARIN et ZAMECNIK, 1964). Le

sRNA est précipité par 2 volumes d'éthanol froid. Après 16 h, il est centrifugé, dissous et dialysé pendant une nuit à 4° contre du NaCl $10^{-3}M$.

2. - Capacité acceptrice des acides ribonucléiques de transfert

a) Préparation enzymatique permettant la fixation des aminoacides aux tRNA

La préparation enzymatique renfermant les aminoacyl-tRNA synthétases est obtenue, à partir de foie de rat prélevé extemporanément, par une technique que nous avons développée en nous basant sur le principe de la méthode de HOAGLAND et coll. (1956).

Le foie est perfusé avec une solution de KCL 0,05 M à 4° afin de le refroidir rapidement. Pour une préparation enzymatique, nous avons utilisé 4 foies. Le broyage ainsi que les différentes centrifugations permettant d'obtenir le surnageant 105.000 g ont été effectuées dans les conditions précédemment décrites.

Les protéines enzymatiques sont précipitées à pH 4,8 à partir du surnageant 105.000 g par addition, goutte à goutte, de HCl 0,1 N à 4°. Le précipité est centrifugé à 10.000 g pendant 10 minutes et remis en suspension dans 20 ml de tampon enzyme dont la composition est la suivante : Tris-HCl 0,1 N à pH 7,4 ; KCl 0,06 M, $MgCl_2$ 0,01 M et glutathion réduit 0,001 M. Les résidus insolubles sont éliminés par centrifugation.

La préparation enzymatique est ensuite chromatographiée sur une colonne contenant 5 ml de DEAE-cellulose SERVA préalablement traitée pendant 30 minutes par NaOH N (1 litre pour 30 g de cellulose) puis lavée avec le tampon enzyme. On élue avec ce même tampon et on recueille les 12 premiers ml. On obtient ainsi une préparation enzymatique débarrassée de sRNA et dont le rapport des densités optiques 280 mμ/260 mμ doit être voisin de 1,75. Dans ces conditions, la concentration en mg de protéines par ml est donnée par la relation :

$$(D.O. \ 280 \times 1,55) \quad - \quad (D.O. \ 260 \times 0,76) \quad (LAYNE, \ 1957)$$

Des fractions de 1 ml sont congelées et peuvent être conservées pendant plusieurs semaines à -70° sans perdre leur activité.

b) Test de l'activité acceptrice des tRNA

Pour mesurer la capacité fixatrice des tRNA, nous avons appliqué la méthode décrite par MANS et NOVELLI (1961). La réaction a lieu dans un volume final de 0,2 ml placé dans un tube à hémolyse. Le milieu réactionnel contient :

- 20 μ g de tRNA
 - 50 μ g de préparation enzymatique (20 μ l d'une solution renfermant 2,5 mg/ml de protéines)
 - 2 μ moles d'ATP
 - 2 μ moles de $MgCl_2$
-) (soit 20 μ l d'une solution 10^{-1} M
) en ATP et en $MgCl_2$, neutralisée
à pH 7 par addition de KOHN)
- 0,4 μ moles de glutathion réduit (10 μ l d'une solution à 12 mg/ml)
 - 40 μ g de serumalbumine (20 μ l d'une solution à 2 mg/ml)
 - 0,01 μ moles (0,5 μ Ci) de $I^{14}C$ aminoacide (10 μ l d'une solution renfermant 1 μ mole d'acidoacide avec une radioactivité de 50 μ Ci/ml)
 - tampon enzyme q.s.p. 0,2 ml.

On incube le mélange à 37° durant 30 minutes. Les tubes sont ensuite refroidis dans la glace.

On dépose 100 μ l de milieu d'incubation sur un disque de papier Whatman "3 MM" de 2 cm de diamètre maintenu par une épingle en laiton nickelé.

On laisse le papier s'imprégner durant 5 à 10 min. avant de le plonger pendant 30 min. dans un bécher contenant du TCA 5 p. 100 froid (4°), pour précipiter les aminoacyl-tRNA.

Les disques sont ensuite soumis à plusieurs lavages effectués à 4° :

- 2 lavages au TCA à 5 p. 100 pendant 15 min.
- 1 lavage à l'éthanol à 95° pendant 15 min.
- 1 lavage au mélange d'éthanol-éther (1 : 3, v/v) pendant 15 min.
- 1 lavage à l'éther pendant 5 min.

Chaque disque est séché puis plongé dans 5 ml de mélange scintillateur (4 g d'omnifluor pour 1 litre de toluène). La radioactivité est mesurée au compteur à scintillation Beckman. Chaque réaction de fixation est effectuée en triple exemplaire ; les valeurs correspondant aux témoins (incubés en l'absence d'ATP) sont déduites de celles des échantillons étudiés.

3. - Influence de la méthode d'extraction sur le rendement et l'activité acceptrice des préparations de tRNA

Les meilleurs rendements en tRNA sont obtenus lors de l'extraction du RNA par le phénol à froid à partir du surnageant cytoplasmique (tableau XII).

T A B L E A U X I I

Influence de la méthode d'extraction sur le rendement en tRNA et sur la capacité acceptrice vis à vis de la sérine

Méthodes de préparation	Rendement en tRNA (mg de tRNA/100g de foie)	Activité acceptrice (μmoles de sérine/mg de tRNA)
tRNA extrait à partir du surnageant 105000g	21	1,93
tRNA extrait à partir du surnageant cytoplasmique	33	1,99
tRNA extrait à partir d'un broyat total selon la technique de DELIHAS et STAEHELIN	22	1,78

La différence de rendement observée lors de l'extraction du sRNA à partir du surnageant cytoplasmique et du surnageant 105.000 g indique que 35 p. 100 du RNA de transfert de la cellule est localisé dans la fraction microsomale et 65 p. 100 dans la fraction soluble.

Le rendement relativement faible obtenu lors de la préparation du sRNA à partir du broyat cellulaire total selon la méthode de DELIHAS et STAEHELIN (1966) est en grande partie due aux pertes entraînées lors de la chromatographie sur colonne de Sephadex G 200.

Nous avons comparé les activités acceptrices des différentes préparations de tRNA vis à vis de la sérine. Comme on peut le voir dans le Tableau XII, ces activités sont très voisines les unes des autres. Le tRNA extrait à partir d'un broyat cellulaire total selon la méthode de DELIHAS et STAEHELIN (1966) semble néanmoins un peu moins actif. Il est possible que cette différence soit liée à une légère chute de l'activité biologique du tRNA consécutive aux divers traitements et surtout au temps prolongé nécessaire à cette préparation. Cette diminution peut également être due à la contamination des préparations de tRNA par des fragments nucléotidiques provenant d'une certaine dégradation des acides nucléiques de haut poids moléculaire.

Pour la suite de notre travail, nous avons extrait le tRNA par le phénol à froid, soit à partir du surnageant cytoplasmique, soit à partir du surnageant 105.000 g. Pour obtenir des résultats reproductibles dans la détermination des capacités acceptrices, il convient de purifier les préparations de tRNA au maximum. Dans ce but, nous avons soumis les tRNA au traitement par le méthylcellosolve ou par le sel d'ammonium quaternaire pour éliminer la totalité des polysaccharides, puis nous avons chromatographié le tRNA sur une colonne de DEAE cellulose. L'analyse dans un gradient linéaire de concentration de saccharose (20 à 5 p. 100) des tRNA ainsi préparés permet d'obtenir le profil d'absorption dans l'ultra-violet représenté dans la figure 52. Il apparaît un pic unique qui sédimente au niveau des concentrations de 6 à 11 p. 100 de saccharose. On n'observe pas de contaminations par du RNA ribosomal ou par du DNA, ni de trainée attribuable à la présence d'oligonucléotides.

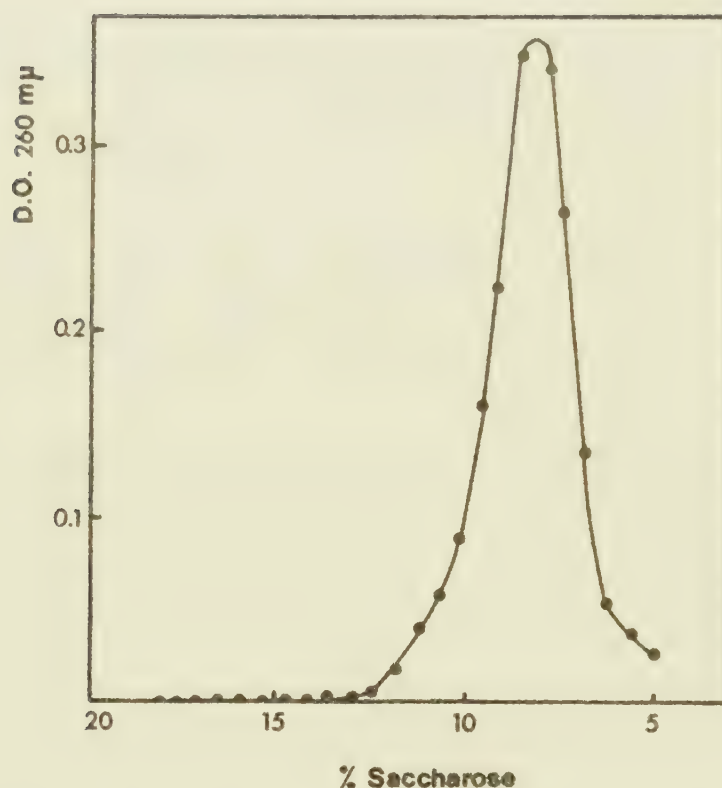


Fig.52 - Profil de sédimentation en gradient de saccharose du t RNA extrait par le phénol à froid à partir du surnageant cytoplasmique, et purifié par traitement au méthylcellosolve et chromatographie sur DEAE cellulose.

En ce qui concerne les aminoacides fixés, les témoins s'élèvent à environ 5 p. 100 de la valeur correspondant à la capacité acceptrice du tRNA (soit 80 à 100 CPM pour 1600 à 2000 CPM de sérine fixée dans le cas d'une prise d'essai de 10 μ g de tRNA total). Les contaminations en polysaccharides que l'on relève lorsque les animaux n'ont pas été soumis à un jeûne efficace peuvent conduire à des erreurs appréciables. En, effet, lorsque ces contaminations sont importantes, on assiste pour les témoins à une adsorption de l'acide marqué pouvant atteindre plus de 50 p. 100 de la capacité acceptrice du tRNA.

4. - Influence de l'origine de la préparation enzymatique sur la capacité acceptrice du tRNA

Nous avons déterminé le nombre de mmoles de ^{14}C aminoacide fixé par mg de tRNA d'après la technique de fixation décrite plus haut et en utilisant, soit une préparation enzymatique extraite à partir de foie de rat, soit une préparation enzymatique extraite à partir de levure de boulangerie dans les conditions décrites par DIRHEIMER et EBEL (1967). Nous avons effectué cette étude avec la sérine et la phénylalanine d'une manière comparative avec le tRNA de levure de bière ; les résultats correspondant à ces expériences sont consignés dans le tableau XIII.

T A B L E A U X I I I

Influence de l'origine de la préparation enzymatique sur les capacités acceptrices des tRNA

tRNA	Enzyme	mmoles de ^{14}C -aminoacide fixées/mg de tRNA	
		Phénylalanine	Sérine
de foie	de foie	0,41	1,99
	de levure	0,23	0,98
de levure	de levure	0,41	1,18
	de foie	0,57	2,26

Dans le cas du tRNA de foie, on constate, aussi bien pour la fixation de la sérine que pour celle de la phénylalanine, qu'il est plus intéressant de travailler avec l'enzyme homologue. En effet, le remplacement de l'enzyme de foie par celui de levure conduit à une diminution d'environ 50 p. 100 de la charge en ^{14}C aminoacide. Pour le tRNA de levure, par contre, nous avons constaté que l'utilisation de l'enzyme hétérologue de foie à la place de l'enzyme homologue de levure améliore sa capacité de fixation vis à vis de l'acide marqué, surtout dans le cas de la sérine.

Ce résultat surprenant rejoint celui rapporté très récemment par TAYLOR et coll. (1968) qui ont étudié l'aminocacylation du tyrosine-tRNA de foie de lapin par l'enzyme homologue et par des enzymes hétérologues (*Saccharomyces* et *E. coli*). Ces auteurs ont également constaté que l'enzyme de foie provoque une fixation de tyrosine, sur le tRNA de levure, supérieure à celle observée avec l'enzyme homologue de levure.

Une interprétation intéressante de ce résultat serait que la préparation enzymatique hétérologue de foie renferme une aminoacyl-tRNA synthétase capable de reconnaître un des divers séryl ou tyrosyl-tRNA de levure, alors que la préparation enzymatique de levure, dans les conditions physiologiques étudiées, en soit dépourvue. Nous nous proposons de vérifier cette hypothèse.

5. - Préparation et séparation chromatographique des ^{14}C et ^3H aminoacyl-tRNA

Pour effectuer cette étude, il est indispensable d'éliminer la totalité des polysaccharides pouvant contaminer les préparations de tRNA. Nous avons déjà vu (chapitre IX, paragraphe 3) que la présence de polysaccharides pouvait entraîner une adsorption non spécifique des aminoacides. De plus, ici il s'avère que la contamination en polysaccharides rend la séparation chromatographique des aminoacyl-tRNA impossible à la suite du colmatage de la colonne.

a) Préparation de ^{14}C ou de ^3H aminoacyl-tRNA

Pour la préparation des aminoacyl-tRNA en grandes quantités, nécessaires pour le fractionnement chromatographique ultérieur, nous avons utilisé la méthode décrite par Von EHRENSTEIN et LIPMAN (1961) avec quelques modifications dans la composition du milieu réactionnel afin d'obtenir des résultats comparables à ceux fournis par les tests d'activité acceptrice. Pour un volume de 1 ml, la composition est la suivante :

tRNA	10 mg
Tris-HCl	200 μmoles
Acétate de Mg^{++}	10 μmoles

A T P	6 μ moles
Phosphoénolpyruvate de sodium	20 μ moles
Pyruvate kinase	40 μ g
Préparation enzymatique	quantité correspondant à 2,5 mg de protéines
Aminoacide $I^{14}C$	500 μ moles
ou	(50 μ Ci/ μ Mole)
Aminoacide 3H	500 μ moles
	(500 μ Ci/ μ Mole)

b) Séparation chromatographique des aminoacyl-tRNA

Nous avons utilisé la technique décrite par WEISS et KELMERS (1967) pour la séparation des tRNA chez *E. coli*.

Il s'agit d'une chromatographie de partage en phase inversée, le mouvement des composés dissous dépend uniquement de leur coefficient de partage entre les deux phases liquides.

La phase organique est constituée par un sel d'ammonium quaternaire, le chlorure de tricaprylylméthylammonium (Aliquat) dissous dans du tétrachlorotétrafluoropropane (fréon) et supportée par une terre de diatomées hydrophobe (Chromosorb).

La phase aqueuse mobile est représentée par un gradient de chlorure de sodium additionné de chlorure de magnésium 0,01 M. La présence de Mg^{++} diminue les interactions entre les tRNA et la colonne ; il semble que ces ions stabilisent la structure tertiaire du tRNA et diminuent ainsi la charge effective du polyanion.

Les profils chromatographiques varient avec la température. Lorsque la température augmente, les chaînes de RNA se déplient et les interactions augmentent ; par conséquent il faudra éluer à une concentration supérieure en NaCl. Les profils varient également en fonction du pH. Lorsqu'on passe du pH 4,5 au pH 7, le partage dans la colonne nécessite une concentration en NaCl plus faible.

Nous avons tout d'abord réalisé un essai de partage à pH 7 et à 25°. Dans ces conditions, il s'est avéré que la radioactivité n'était pas retenue sur la colonne, ce phénomène correspondant à un détachement des aminoacides marqués du tRNA spécifique. Par la suite, nous avons travaillé à 25° avec le tampon acétate de sodium 0,01 M à pH 4,7 en présence de MgCl_2 0,01 M ; dans ce cas, nous avons obtenu des résultats satisfaisants.

(α) Préparation de la phase organique.

L'Aliquat "336" est dissous à raison de 5 % dans du fréon "214". On lave successivement avec 2 volumes de NaOH M, HCl M et NaCl 0,5 M pour éliminer tous les contaminants solubles dans l'eau. La phase organique est séparée et séchée sur silicagel pendant une nuit dans un dessiccateur.

On verse lentement 56 ml de la phase organique dans 100 g de Chromosorb "W" en agitant régulièrement à la main. Puis le mélange est agité mécaniquement pendant 2 heures dans un flacon en plastique. On laisse reposer pendant un minimum de 5 jours pour assurer une distribution égale de la phase organique sur le support solide.

(β) Préparation de la colonne.

On remplit une colonne de 250 cm de haut et de 0,9 cm de diamètre avec la solution d'élution initiale puis on ajoute lentement la poudre de Chromosorb préalablement traitée. La colonne, tout en se tassant un peu, est lavée pendant une nuit avec la solution d'élution initiale.

L'échantillon à analyser (5 à 15 mg de tRNA) est placé sur la colonne dans un volume de 3 à 5 ml.

L'élution est réalisée par un gradient linéaire de NaCl 0,22 à 0,62 M dans un volume de 2 litres de tampon acétate 0,01 M pH 4,7 - MgCl_2 0,01 M. Les solutions d'élution sont préalablement saturées avec 3 ml de fréon par litre.

(γ) Expression des résultats.

On recueille 200 fractions de 10 ml. La lecture de l'absorption à 260 mμ permet d'établir la courbe de D.O. en fonction du nombre des fractions. La radioactivité est déterminée par prélèvement de 5 ml de chaque fraction qui sont placés dans une fiole de compteur puis séchés à l'étuve pendant 4 h à 110°. Après refroidissement, on ajoute 5 ml de mélange scintillateur (4g d'omnifluor dans 1 litre de toluène). La radioactivité est mesurée dans un compteur Beckman.

CHAPITRE IX

COMPARAISON DES RNA DE TRANSFERT DES FOIES DE RATS NORMAUX ET HYPOPHYSECTOMISES

1. - Comparaison des capacités acceptrices des tRNA de foie de rats normaux et hypophysectomisés en présence d'une préparation enzymatique de foie de rats normaux

a) Mise en évidence d'une diminution de la capacité acceptrice des tRNA de foie de rats hypophysecto- misés

Les résultats obtenus avec 10 aminoacides différents sont consignés dans le tableau XIV. Nous avons représenté la radioactivité incorporée en CPM et en μ moles de ^{14}C aminoacide par mg de RNA, ainsi que le pourcentage de fixation pour chaque aminoacide. Ces essais ont été effectués avec 20 μg de tRNA. La figure 53, qui indique le taux de fixation de l'acide amino en fonction de la quantité de tRNA introduite dans le mélange réactionnel montre qu'avec 20 μg de tRNA on se trouve dans la zone linéaire de la courbe de fixation.

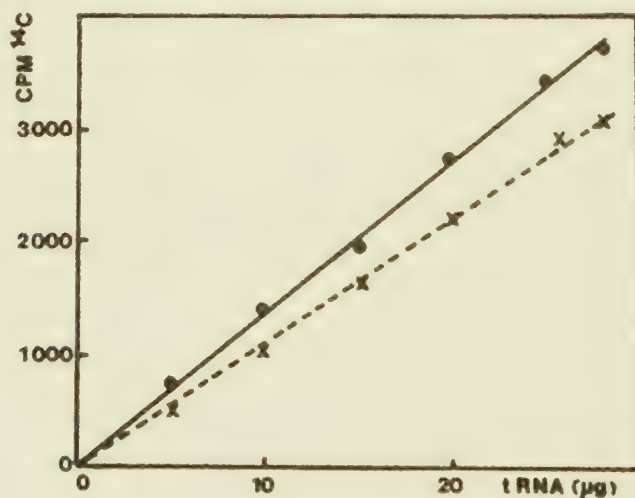


Fig.53 - Fixation de ^{14}C sérine par différentes quantités de tRNA de foie de rat ajoutées dans 0,2 ml de mélange réactionnel.

•——• Foie de rat normal
x-----x Foie de rat hypophysectomisé

T A B L E A U XIV

Fixation des aminoacides par des tRNA de foie de rats
normaux et hypophysectomisés

Amino- acide	Activité spécifique $\times 10^{-3}$	Nature du tRNA étudié	Radioactivité incorporée par mg		^{14}C -aa. fixé (p. 100)	Chute du taux de fixation $(\frac{\text{N-H}}{\text{N}} \times 100)$
			CPM $\times 10^{-3}$	de RNA m μ M ^{14}C -aa. fixé		
Ac. aspart.	70	N	52,7	0,75	2,0	11,3
		H	46,5	0,66	1,8	
Glycine	50	N	50	1,0	2,7	12
		H	44	0,88	2,4	
Alanine	65	N	78,4	1,21 (1,17)*	3,3	17,3
		H	65,4	1,0 (0,96)	2,7	
Sérine	63	N	135	1,99 (1,93)*	5,3	17,5
		H	103,8	1,64 (1,56)	4,2	
Leucine	68,2	N	121	1,77 (1,67)*	4,9	18,6
		H	98,55	1,44 (1,32)	3,9	
Isoleucine	98	N	53	0,53 (0,41)*	1,4	22,6
		H	40	0,41 (0,36)	1,1	
Arginine	60,9	N	74,3	1,22 (1,28)*	3,3	30
		H	51,8	0,85 (0,98)	2,3	
Lysine	70,9	N	95,9	1,2	3,2	30
		H	67,1	0,84	2,2	
Valine	58,7	N	64,6	1,1 (1,12)*	3,0	33
		H	43,4	0,74 (0,80)	2,0	
Phénylal.	20,9	N	23,0	1,1	3,0	34
		H	15,0	1,2	1,9	

Cette étude a été réalisée avec les tRNA extraits à partir du surnageant 105 000 g.

* Les chiffres entre parenthèses correspondent aux tRNA extraits à partir du surnageant cytoplasmique ; pour ces valeurs, nous n'avons pas fait figurer le détail des calculs.

Pour les tRNA provenant de foie d'animaux hypophysectomisés (tRNA-H), on observe, pour une même quantité de tRNA, une diminution de la capacité acceptrice par rapport aux tRNA de foie d'animaux normaux (tRNA-N). Ce phénomène apparaît aussi bien avec le tRNA lié aux microsomes qu'avec le tRNA libre ; en effet, les valeurs correspondant aux tRNA extraits à partir du surnageant 105.000 g, ou à partir du surnageant cytoplasmique, sont du même ordre de grandeur. Cependant, la diminution du taux de fixation par rapport à celui du tRNA de foie d'animaux normaux est variable suivant l'acide aminé considéré. Elle est importante pour la valine, l'arginine, la phénylalanine et la lysine (30 à 34 %), moins importante pour l'isoleucine, la sérine et l'alanine (17 à 22 %) et nettement plus faible pour la glycine et l'acide aspartique (11 à 12 %).

b) Etude de certains facteurs pouvant entraîner la diminution de la capacité acceptrice des tRNA

Pour vérifier que la diminution de la capacité acceptrice observée avec les tRNA de foie d'animaux hypophysectomisés ne résulte pas d'un artéfact, nous avons étudié comparativement l'influence de divers facteurs susceptibles d'affecter la capacité acceptrice des tRNA. Une différence dans les conditions optimales des réactions de fixation, un détachement plus important du triplet pCpCpA terminal ou une proportion de molécules dénaturées supérieures à celle des tRNA de foie de rats normaux, pourraient en effet être à l'origine de la diminution d'activité que nous avons observée.

(α) Conditions optimales de fixation de l'arginine et de la sérine.

- cinétique de fixation

Il se pourrait qu'en fixant le temps d'incubation à 30 min., durée pour laquelle la fixation par les tRNA de foie d'animaux normaux est maximale, cette valeur optimale ne soit pas encore atteinte pour la réaction de fixation par les tRNA de foie d'animaux hypophysectomisés. Mais nous avons constaté (figure 54) que, quel que soit le temps d'incubation, les tRNA de foie d'animaux hypophysectomisés fixent toujours moins d'acide aminé que les tRNA témoins.

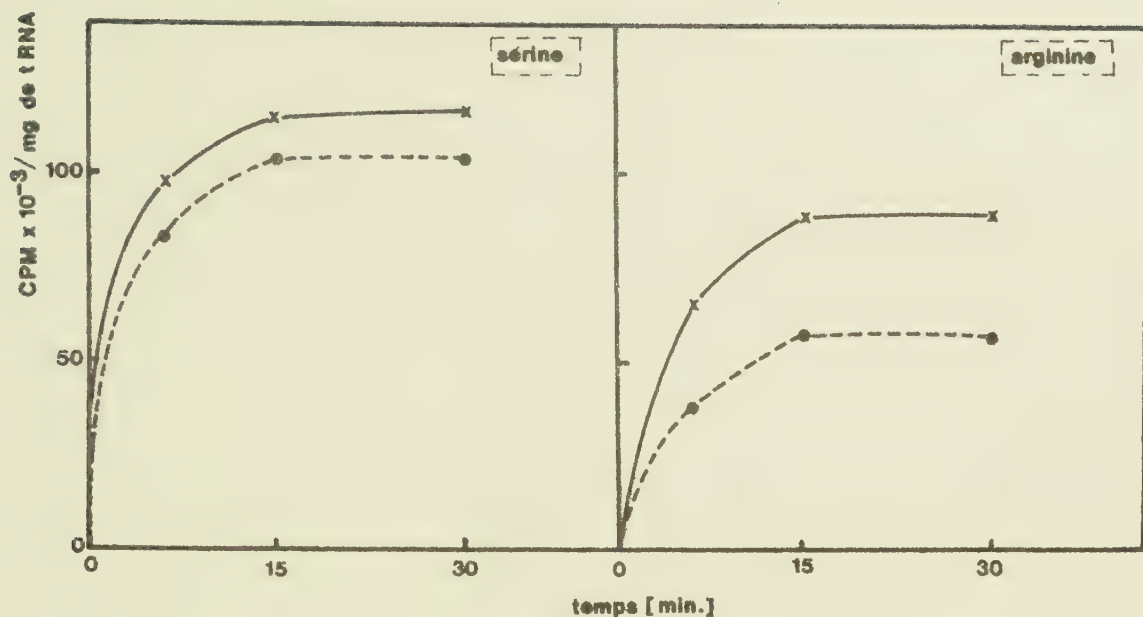


Fig.54 - Cinétique de la fixation de la sérine et de l'arginine sur les t RNA de foie de rat.

x — x, t RNA-N

o - - - o, t RNA-H

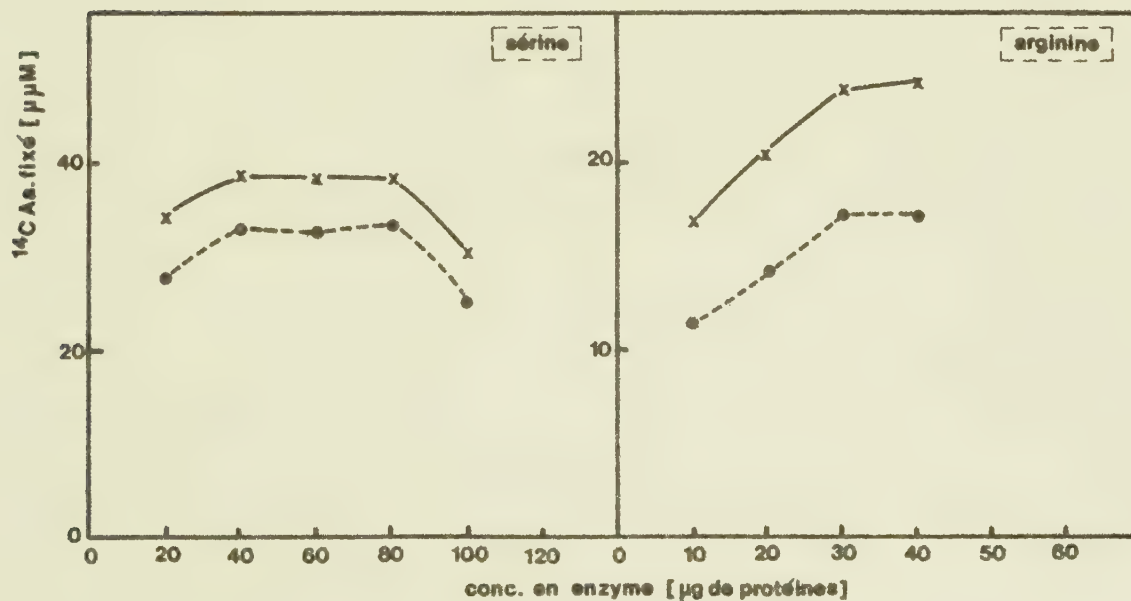


Fig.55- Etude de la capacité acceptrice des t RNA de foie de rat en fonction de la concentration en enzyme.

x — x, t RNA-N

o - - - o, t RNA-H

(La concentration en enzyme est exprimée en μg de protéines enzymatiques introduites dans 0,2 ml de milieu d'incubation contenant 20 μg de t RNA).

D'autre part, il apparaît que la fixation optimale est en général déjà atteinte après 15 min. d'incubation.

- Concentration en aminoacide

Nous avons vérifié que la concentration optimale en aminoacide est bien de 0,01 à 0,02 μ moles par réaction, quelle que soit l'origine ou la nature du tRNA étudié. Pour les tests de fixation, nous avons en général choisi la concentration de 0,01 μ moles qui permet à la capacité acceptrice de s'exprimer à un taux de 95 p. 100 au moins.

- Influence des concentrations relatives de Mg^{++} et d'ATP

Nous avons déterminé la valeur du rapport Mg^{++}/ATP qui permet d'obtenir l'activation optimale de l'acide aminé étudié. Une valeur de 1 correspond en général aux conditions requises pour atteindre une fixation maximale qu'il s'agisse de tRNA de foie de rats normaux ou hypophysectomisés.

- Concentration en enzyme

La concentration optimale en enzyme dépend de la préparation enzymatique. Suivant les expériences, elle varie entre 20 et 50 μ g de protéines enzymatiques ; c'est pourquoi nous avons choisi cette dernière concentration dans nos réactions.

La figure 55 rend compte de la capacité acceptrice des tRNA extraits à partir de foie d'animaux normaux ou hypophysectomisés en fonction de la concentration en préparation enzymatique provenant de foie de rats normaux. Quelle que soit la concentration en enzyme, on constate que la capacité acceptrice des tRNA de foie de rats normaux est toujours supérieure à celle des tRNA de foie de rats hypophysectomisés.

(β) Fixation des acides aminés sur les tRNA dans les conditions permettant le réattachement du triplet terminal pCpCpA.

On sait que tous les tRNA ont un triplet terminal pCpCpA dont l'intégrité est indispensable à la fixation des

aminoacides. Le renouvellement de ce triplet, *in vivo*, est relativement rapide et a lieu grâce à un enzyme, la pCpCpA - pyrophosphorylase. Le détachement du triplet peut se faire soit par action réversible de la pCpCpA-pyrophosphorylase, soit par action de la phosphodiésterase. Cette attaque n'est pas possible lorsque le tRNA est estérifié par son aminoacide.

Il se pourrait que la proportion des tRNA déchargés de leur aminoacide soit supérieure dans le cas du foie des animaux hypophysectomisés ; de ce fait, ces tRNA seraient plus facilement attaqués par les enzymes précédents et par conséquent plus largement dépourvus de leur triplet pCpCpA. Dans ce cas, leur capacité acceptrice sera diminuée. Mais si le test de fixation de l'aminoacide se fait dans des conditions où le triplet pCpCpA est rattaché, les différences dans la capacité acceptrice devraient disparaître.

Les réactions de fixation des aminoacides aux tRNA se font en présence d'ATP. Dans ces conditions, comme la préparation enzymatique que nous utilisons contient également la pCpCpA - pyrophosphorylase, les tRNA ayant perdu uniquement le A terminal et ayant par conséquent une séquence pCpC intacte peuvent refixer ce A terminal et redevenir aptes à fixer les aminoacides. Par contre, ceux ayant perdu, outre le A terminal, un ou deux C, ne peuvent pas dans les conditions où sont normalement réalisées les fixations d'aminoacides, en absence de CTP, reformer leur triplet terminal et seront, de ce fait, incapables de fixer les aminoacides. C'est pourquoi nous avons incubé les tRNA en présence non seulement d'ATP, mais aussi de CTP, suivant les conditions décrites par GIEGE et EBEL (1968) dans le cas de la levure. Cette technique consiste à ajouter 0,2 μ moles de CTP (1/10 de la quantité d'ATP) dans le mélange réactionnel préparé pour la fixation de l'aminoacide. Les tRNA qui initialement étaient dépourvus de leur triplet terminal deviennent alors aptes à accepter les aminoacides.

Le tableau XV montre que la fixation des aminoacides en présence d'ATP et de CTP est du même ordre de grandeur que celle observée en présence d'ATP uniquement. Le fait que l'addition de CTP ne change rien à la fixation des aminoacides sur les tRNA de foie de rats normaux et hypophysectomisés indique donc que les variations d'activité accep-

trice observées pour les deux catégories de tRNA ne sont pas dûes à des différences dans l'intégrité du triplet terminal pCpCpA.

T A B L E A U X V

Activités acceptrices des tRNA de foie de rats
normaux et hypophysectomisés, dans les condi-
tions permettant le réattachement du triplet
pCpCpA

Aminoacides étudiés Conditions de fixation	Activité acceptrice mµmoles de ¹⁴ C-aminoacide fixées / mg de tRNA	
	tRNA-H	tRNA-H
Sérine + ATP + ATP + CTP	1,93	1,55
	1,91	1,56
Arginine + ATP + ATP + CTP	1,47	0,75
	1,70	0,80
Valine + ATP + ATP + CTP	1,04	0,65
	1,14	0,70

(γ) Essais de renaturation des tRNA.

Au cours de leur extraction, les tRNA peuvent se trouver sous une forme dénaturée, biologiquement inactive. Mais la plupart des tRNA spécifiques se renaturent spontanément dans le milieu réactionnel lorsqu'on réalise le test de fixation. Dans le cas de la levure, par ex. certains tRNA seulement, tel le leucyl-tRNA, doivent subir un traitement spécial pour reprendre leur forme initiale, biologiquement active (LINDAHL et coll. 1966). Nous avons pensé qu'un tel phénomène de dénaturation pourrait expliquer les diminutions de la capacité fixatrice des tRNA de foie d'animaux hypophysectomisés. Les molécules de tRNA, plus sensibles aux conditions d'extraction, seraient dénaturées et par la suite resteraient inactives dans nos conditions de fixation des aminoacides alors que les tRNA

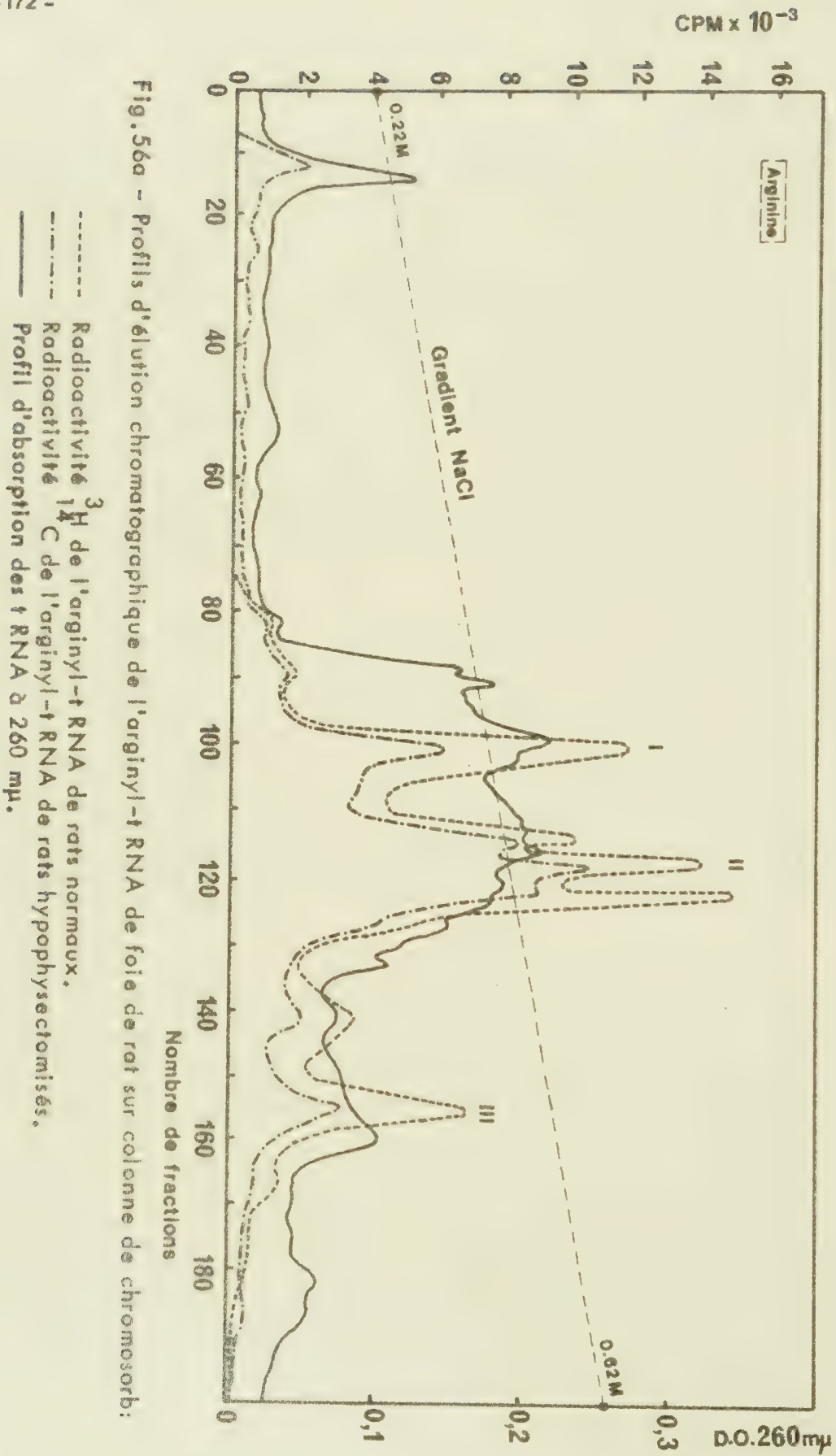
de foie de rats normaux pourraient être soit moins sensibles à la dénaturation, soit renaturés plus facilement. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons soumis les deux catégories de tRNA au test de renaturation dans les conditions décrites par LINDAHL et coll. (1966) et nous avons comparé la fixation de certains aminoacides (sérine, valine, arginine, alanine) avant et après renaturation. Nos expériences montrent qu'il n'y a pas de différence entre les tRNA natifs ou les tRNA soumis à un test de renaturation. De plus, les mêmes différences subsistent entre les capacités acceptrices des tRNA de foie de rats normaux ou hypophysectomisés.

2. - Comparaison des profils de fractionnement chromatographique des tRNA de foie de rats normaux ou hypophysectomisés, chargés avec une préparation enzymatique de foie de rats normaux

Nous avons chromatographié sur colonne de Chromosorb, dans les conditions décrites par WEISS et KELMERS (1967) et relatées précédemment (chapitre IX, paragraphe 5b), un mélange de tRNA cytoplasmique de foie de rats normaux chargé avec l'acide aminé marqué au ^3H et de foie de rats hypophysectomisés chargé avec l'acide aminé marqué au ^{14}C . Cette étude a été réalisée avec l'arginine et la valine qui sont des acides aminés vis à vis desquels les capacités acceptrices des 2 catégories de tRNA présentent une différence importante (tableau XIV). Les profils d'élution correspondant à ces expériences sont indiqués dans les figures 56 a et 56 b.

On s'aperçoit que la méthode employée permet d'obtenir un fractionnement extrêmement efficace des divers tRNA de foie de rat. Le profil de marquage correspondant à l'arginyl-tRNA fait essentiellement apparaître 3 pics. Pour la valine, on note la présence de 2 constituants majeurs accompagnés d'un constituant mineur dont l'élution a lieu avant celle des deux autres.

Les profils d'élution des tRNA de foie de rats normaux et hypophysectomisés sont très voisins. L'évaluation du rapport des activités spécifiques, ^{14}C -acide aminé / ^3H -acide aminé, ne permet de mettre en évidence que de faibles différences. Pour que ces dernières puissent être considérées



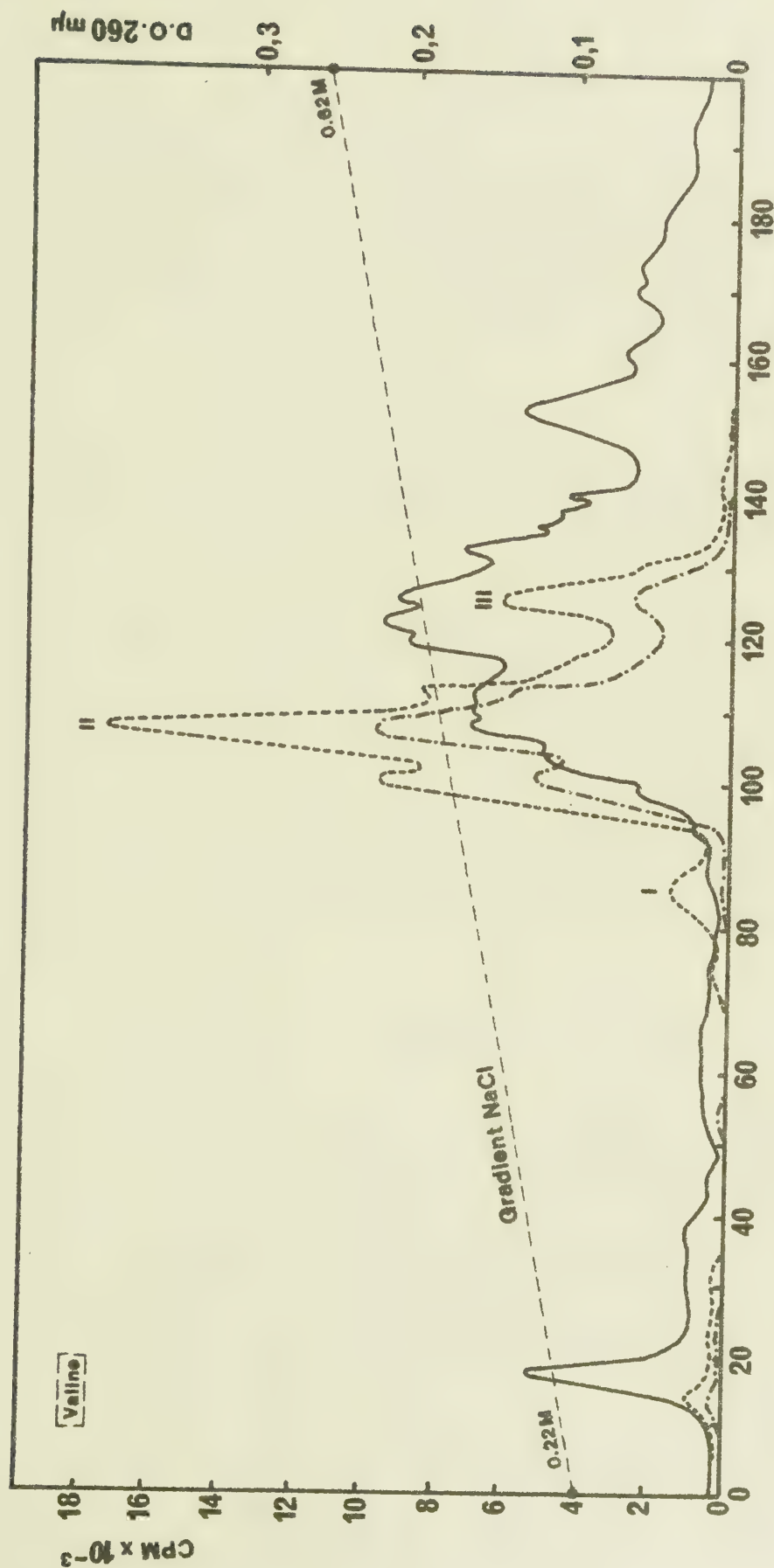


Fig. 56b - Profils d'élution chromatographique du valyl-tRNA de foie de rat sur colonne de chromosorb:

- Radioactivité ³H du valyl-tRNA de rats normaux.
- . - . - . Radioactivité ¹⁴C du valyl-tRNA de rats hypophysectomisés.
- Profil d'absorption des tRNA à 260 mμ.

comme significatives, il est nécessaire de reproduire les expériences en nombre plus élevé. Il conviendrait aussi, pour être certain de ces résultats, d'effectuer une expérience de contrôle consistant à inverser le marquage des tRNA en fixant l'acide-amino- ^{14}C à la place de l'acide-amino- ^3H , ceci dans le but d'éviter des artefacts dus à la nature de l'isotope utilisé. Ce travail long et onéreux n'a pas encore pu être réalisé.

La différence la plus significative est observée dans le cas du valyl-tRNA où le pic mineur I présent dans le tRNA de foie de rats normaux est absent dans le tRNA de foie de rats hypophysectomisés.

B. ESSAI DE MISE EN EVIDENCE DE DIFFERENCES AU NIVEAU DES ENZYMES DE FIXATION : Comparaison des capacités acceptrices des tRNA en présence d'enzyme de foie de rats normaux ou hypophysectomisés.

Des expériences croisées entre tRNA et enzyme, provenant de foie de rats normaux ou hypophysectomisés, effectuées avec la sérine, l'arginine et la valine ont conduit aux résultats consignés dans le tableau XVI.

T A B L E A U X V I

Influence de l'origine de la préparation enzymatique sur la capacité acceptrice des tRNA

Enzyme	Aminoacide étudié	nmoles ^{14}C -aminoacide fixées/mg de tRNA	
		tRNA-N	tRNA-H
E-N	Sérine	2,00	1,72
	Arginine	1,28	0,98
	Valine	1,15	0,85
E-H	Sérine	1,75	1,36
	Arginine	1,00	0,87
	Valine	0,92	0,76

La substitution de l'enzyme de foie d'animaux normaux par celui de foie d'animaux hypophysectomisés provoque une diminution du taux de ^{14}C -aminoacide fixé aussi bien sur le tRNA de foie d'animaux normaux que sur celui d'animaux hypophysectomisés. Nous avons réalisé les réactions de fixation avec des concentrations d'enzyme (40 et 80 μg de protéines enzymatiques par essai), pour lesquelles nous avons constaté que le maximum de fixation était atteint, aussi bien avec la préparation enzymatique extraite de foies d'animaux normaux qu'avec celle extraite de foies d'animaux hypophysectomisés.

Ces observations suggèrent que l'hypophysectomie conduit à des différences non seulement au niveau des diverses espèces de tRNA mais également au niveau des aminoacyl-tRNA synthétases.

DISCUSSION

Il apparaît, à la suite de cette étude, que les tRNA provenant de foie d'animaux hypophysectomisés présentent une capacité acceptrice inférieure à celle des tRNA de foie d'animaux normaux. Cette diminution de la capacité acceptrice est un phénomène intéressant et il convenait tout d'abord de vérifier s'il ne s'agissait pas là d'un artefact.

Signalons tout de suite que cette diminution affecte différemment la fixation de divers aminoacides ; il ne peut donc pas s'agir d'un simple processus de dilution par un RNA autre que le tRNA, par exemple des produits de dégradation du DNA ou du RNA ribosomal, apparaissant à la suite d'un ralentissement d'activité de la cellule hépatique. Par ailleurs, nous avons vérifié que les conditions expérimentales employées au cours de nos tests de fixation (température, pH, concentration en Mg^{++} et en ATP) étaient les conditions optimales quel que soit le tRNA étudié. La diminution d'activité n'est pas davantage liée à des différences dans les procédés d'extraction des tRNA et elle affecte aussi bien le tRNA cytoplasmique que celui de la fraction soluble 105.000g.

La chute observée pourrait aussi s'interpréter par des différences dans l'intégrité du triplet pCpCpA terminal. En effet, si les tRNA de foie d'animaux hypophysectomisés étaient plus facilement déchargés de leurs aminoacides, ils deviendraient plus accessibles aux enzymes de dégradation et perdraient davantage leur triplet terminal. Mais, nous n'avons pas observé de variations significatives dans les fixations des aminoacides lorsque ces dernières sont réalisées dans des conditions permettant au triplet pCpCpA de se reformer (c'est-à-dire en présence à la fois d'ATP, de CTP et de pyrophosphorylase).

Mais ceci n'exclut pas la possibilité que les tRNA de foie d'animaux hypophysectomisés subissent une dégradation au-delà du triplet pCpCpA terminal à la suite d'un renouvellement métabolique diminué. Dans ce cas, le triplet pCpCpA ne pourrait plus être reformé. Si une telle dégradation avait lieu, il faudrait admettre qu'elle ne se fasse pas d'une manière égale d'un tRNA à l'autre. Mais cette possibilité est difficile à vérifier.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer le phénomène observé serait que la configuration tertiaire des tRNA subisse une altération plus importante dans le cas des animaux hypophysectomisés. C'est pourquoi, nous avons soumis les tRNA à un test de renaturation préconisé par LINDAHL et coll. (1966). Ce traitement ne nous a pas permis de trouver de différence dans l'activité biologique des divers tRNA étudiés. Cependant, ce résultat n'est significatif que dans la mesure où le test de renaturation que nous avons employé est d'une efficacité générale.

La chute de la capacité acceptrice des tRNA de foie d'animaux hypophysectomisés pourrait s'interpréter par la disparition de certains types de tRNA spécifiques d'un aminoacide. On sait, en effet, qu'il existe plusieurs espèces de tRNA spécifiques d'un même aminoacide et présentant des différences de structure. On pourrait imaginer que la synthèse de l'un de ces tRNA soit diminuée chez les animaux hypophysectomisés. Nous avons essayé de mettre en évidence de telles différences qualitatives. Mais des expériences préliminaires de fractionnement sur colonne de Chromosorb, ne nous ont permis de montrer, malgré le pouvoir de résolution

élevé de la méthode, que des différences très faibles qui ne pourraient être considérées comme significatives qu'à la faveur d'une étude plus systématique. Il semble donc que l'altération de la capacité de fixation des tRNA consécutive à l'hypophysectomie, ne soit pas due à la disparition préférentielle de l'un ou de l'autre tRNA spécifiques d'un même aminoacide.

On peut également envisager que les tRNA de foie d'animaux hypophysectomisés diffèrent des tRNA normaux par le fait que les modifications conduisant aux bases anormales (méthylation ; passage de l'adénine à l'inosine ou à l'isopentényladénine ; transformation de l'uracile en thymine, en dihydrouracile ou en thiouracile, passage de l'uridine à la pseudouridine) ne se font pas ou se font à un degré moindre. Il pourrait en résulter un effet sur la capacité acceptrice soit direct, si une de ces bases anormales fait partie du site de reconnaissance des aminoacyl-tRNA synthétases, soit indirect, si l'absence de bases mineures conduit à une altération de la structure secondaire ou tertiaire nécessaire à l'activité biologique du tRNA. L'étude des bases et des nucléosides anormaux des tRNA étant actuellement possible, nous nous proposons de vérifier cette hypothèse.

Les expériences précédentes ont été réalisées avec des aminoacyl-tRNA synthétases extraites de foies de rats normaux. Nous avons constaté qu'il est important de travailler avec des systèmes homologues, car le remplacement de l'enzyme de foie de rat par celui de levure diminue fortement la capacité acceptrice des tRNA de foie de rat. La comparaison des capacités acceptrices des tRNA en présence d'enzymes de foie de rats normaux ou hypophysectomisés met en évidence une diminution du taux de ^{14}C -aminoacide fixé en utilisant l'enzyme de foie d'animaux hypophysectomisés.

On observe donc, chez les animaux hypophysectomisés, une diminution d'activité non seulement au niveau des tRNA mais aussi au niveau des aminoacyl-tRNA synthétases. Il serait extrêmement intéressant de préciser les raisons de cette inactivation partielle des enzymes. Celle-ci pourrait se traduire par l'absence, dans les préparations enzymatiques de foie d'animaux hypophysectomisés, de certaines aminoacyl-

tRNA synthétases des tRNA spécifiques d'un même aminoacide. Par exemple, dans le cas de l'arginine-tRNA qui présente 3 constituants, l'enzyme ne serait plus capable de reconnaître l'un d'entre eux.

Le résultat que nous avons observé dans le cas des enzymes extraits de foie de rats hypophysectomisés peut être rapproché des travaux de STREHLER et coll. (1968) qui ont étudié comparativement l'activité des aminoacyl-tRNA synthétases spécifiques d'un même aminoacide, extraites à partir de différents organes et à divers stades du développement de l'animal (lapin). Ils ont montré par un fractionnement sur DEAE-cellulose que la chute d'activité était due à l'absence d'une fraction bien définie dans la préparation enzymatique.

DISCUSSION GENERALE

L'évolution récente de la Biologie Moléculaire a influencé profondément nos concepts en Endocrinologie. De plus en plus, la tendance s'est manifestée à exprimer le contrôle hormonal de la biosynthèse des protéines en langage de régulation au niveau des RNA messagers. Les remarquables observations de KARLSON et de ses collaborateurs (1963) ont retenu l'attention d'un grand nombre d'endocrinologistes. Le fait que l'ecdysone stimule la synthèse de molécules spécifiques de RNA messagers en agissant directement sur des loci particuliers du génome et en induisant la synthèse de novo de la DOPA-décarboxylase a amené beaucoup de chercheurs à généraliser ce concept et à l'étendre à d'autres actions hormonales.

Ainsi, dans le cas de l'hormone de croissance, KORNER a le premier étudié les mécanismes d'action sous cet angle à l'échelle cellulaire et moléculaire (Pour une revue générale de la question, se référer à "Recent Progress in Hormone Research, 1965, 21, 205). Il a apporté plusieurs arguments en faveur de l'activation de la synthèse des RNA messagers dans le foie de rat, quelques heures après l'injection de cette hormone aux animaux. Dans ses derniers travaux, il suggère cependant une pluralité d'actions possibles dans le contrôle de la protéosynthèse, sans pouvoir nettement préciser où se situe l'action primaire.

WAGLE (1963) a montré que l'hypophysectomie entraînait parallèlement à la déplétion de la synthèse protéique in vivo, une diminution de l'activité d'incorporation des aminoacides dans les protéines in vitro au niveau des ribosomes de foie de rat. Cette activité pouvait être partiellement restaurée par un traitement préalable des rats avec l'hormone de croissance.

TALWAR et coll. (1964) ont mis en évidence, dans le foie de rats traités avec l'hormone somatotrope, une activation de la synthèse des RNA nucléaires et particulièrement du RNA nucléolaire, s'accompagnant secondairement d'une augmentation du RNA ribosomal cytoplasmique.

RAMUZ et coll. (1965) et WIDNELL et TATA (1966) ont observé une augmentation de l'activité de la RNA polymérase du foie de rat, environ 3 heures après l'injection d'hormone somatotrope aux animaux normaux ou hypophysectomisés.

Enfin, STAEHELIN (1965) a constaté une diminution relative, chez le rat hypophysectomisé, des polysomes du foie par rapport aux monosomes et aux oligosomes.

Tous ces résultats ont été interprétés au départ plus ou moins dans le sens d'une action directe de l'hormone de croissance par dérégulation au niveau des gènes. La diminution de la synthèse protéique, consécutive à l'hypophysectomie serait elle-même le résultat d'une certaine carence des cellules cibles en RNA messenger.

Nos premiers résultats obtenus dès 1963 pouvaient se prêter à une telle interprétation. En effet, nous avons constaté un ralentissement du "turn-over" des RNA nucléaires dans le foie des animaux hypophysectomisés. De plus, nous avons observé une diminution de 30 à 40 p. 100 du taux de RNA total dans les foies de ces animaux par rapport à celui des foies de rats normaux. Parallèlement, l'examen microscopique a permis de mettre en évidence une diminution importante du glycogène ainsi qu'une fragmentation et une dégranulation partielle des citernes ergastoplasmiques et une raréfaction des ribosomes dans l'hépatocyte des animaux hypophysectomisés.

Cependant, aucune différence qualitative dans la distribution des masses moléculaires n'a pu être mise en évidence pour les RNA nucléaires à marquage rapide, ni pour les autres types de RNA. De toute façon, une grande prudence s'impose dans l'interprétation de telles différences. En effet, nous avons constaté que toute une série de facteurs méthodologiques pouvaient se répercuter sur l'aspect des profils d'analyse par sédimentation en gradient de saccharose, des RNA nucléaires. Nous avons ainsi, selon certaines conditions expérimentales intervenant à la fois au stade de l'isolement et de la purification des noyaux et à celui de l'extraction et de l'analyse des RNA, pu obtenir des RNA nucléaires lourds à marquage rapide de constante de sédimentation supérieure à 30 S, des RNA légers à marquage rapide avec des

constantes de sédimentation de 8 à 14 S, ainsi que des RNA rapidement marqués très polydisperses dont les constantes de sédimentation se répartissaient de 4 S jusqu'à 35 S. Des interprétations d'ordre physiologique de tels changements dans les caractéristiques de sédimentation des RNA à marquage rapide nous semblent pour cette raison hasardeuses. Dire qu'il s'agirait dans le premier cas de RNA messagers polycistroniques, dans le deuxième de mRNA monocistroniques et dans le dernier cas d'un mélange de ces deux types de mRNA serait présumptif.

Il est intéressant de rappeler qu'à partir des noyaux de type ZALTA, nous n'avons jamais pu obtenir un RNA de constante de sédimentation supérieure à 18 S. Dans ce cas, le RNA à marquage rapide présente une forte activité spécifique localisée dans un pic prédominant de 13 S. Cette constante correspond à des RNA renfermant environ 1500 nucléotides qui pourraient effectivement coder pour des protéines de taille importante, comme la sérumalbumine qui est constituée par environ 500 aminoacides et possède un poids moléculaire de l'ordre de 62.000. Il faut souligner que les préparations de RNA obtenues à partir des noyaux de type ZALTA ne sont pas seulement caractérisées par la présence d'un RNA à marquage rapide de faible constante de sédimentation, mais aussi par l'absence des constituants normaux du RNA ribosomal. On pourrait de ce fait avancer l'idée que les RNA à marquage rapide lourds ou polydisperses puissent représenter des artéfacts dûs à des interactions des RNA rapidement marqués avec le RNA ribosomal ou encore avec des précurseurs du RNA ribosomal. Nos propres expériences de sédimentation d'un même RNA à marquage rapide, en présence ou en l'absence du RNA ribosomal intact ou dégradé et dans des conditions de force ionique variées, pourraient être en faveur de la formation de tels agrégats.

Une autre hypothèse à considérer est celle proposée et qualifiée de "non orthodoxe" par HADJIOLOV (1967). Dans cette hypothèse, l'auteur envisage, sur la base de certaines données expérimentales, que le RNA messenger dans les cellules animales ne serait pas synthétisé comme une molécule indépendante, mais sous forme d'une chaîne polynucléotidique hybride renfermant à la fois le RNA 18 S et le RNA messenger qui existerait ainsi sous forme "masquée".

Il semble donc difficile, dans l'état actuel de nos connaissances, de caractériser sans ambiguïté les RNA messagers par leurs propriétés physicochimiques de marquage rapide et de masse moléculaire. Aussi avons-nous essayé d'utiliser concomitamment au critère de marquage rapide des RNA, celui de la stimulation de la synthèse protéique dans un système acellulaire.

Un tel système présente l'avantage de nous renseigner sur le taux et éventuellement sur la nature des RNA messagers présents dans les cellules soumises à l'action hormonale, mais aussi de permettre la mise en évidence d'une action régulatrice éventuelle de l'hormone au niveau des mécanismes de traduction.

Cette étude pouvait être envisagée de deux manières. On pouvait mesurer la capacité de stimulation par les mRNA extraits des tissus soumis ou non à l'action hormonale "in vivo", en présence de ribosomes homologues ou hétérologues. La deuxième manière consistait à évaluer l'activité des RNA messagers non isolés, directement dans les systèmes homologues constitués du tissu cible de l'hormone.

En vue de cette étude, nous avons élaboré un système acellulaire microsomal de foie de rat, capable de synthétiser des protéines en présence de mRNA. Il apparut rapidement que les conditions requises pour la synthèse protéique dans les systèmes acellulaires bactériens n'étaient pas applicables sans modifications au système hépatique du rat. Nous avons défini toute une série de facteurs et de conditions pour reconstituer un système acellulaire microsomal permettant d'obtenir d'une manière reproductible, à la fois une incorporation élevée des aminoacides dans les protéines en présence du RNA messenger endogène et, après inactivation de ce dernier par préincubation, une forte stimulation de l'incorporation de la phénylalanine en présence de poly U (SCHMITT et coll., 1967). Les facteurs de stimulation de l'incorporation des aminoacides obtenus avec le poly U dans ce système, après préincubation, sont élevés et dépassent les valeurs généralement obtenues par d'autres auteurs avec des systèmes acellulaires analogues, même les plus fortes décrites dans la littérature et obtenues avec des systèmes acellulaires d'origine tumorale.

Il faut cependant signaler une limitation importante dans l'étude de la synthèse protéique dans ce système et, d'une manière plus générale, dans les systèmes acellulaires préparés à partir de tissus animaux. Ces systèmes fonctionnent bien avec le RNA messenger endogène présent dans les polysomes ou, après incubation, avec le poly U. Mais, ils sont totalement inactifs lorsque l'on ajoute après préincubation un mRNA naturel exogène. Ce dernier provoque cependant une certaine stimulation de la capacité d'incorporation des aminoacides dans les protéines, lorsqu'il est ajouté au système non préincubé. Mais, il n'est pas possible d'affirmer que cette stimulation correspond réellement à la traduction du message apporté par le mRNA exogène. On peut spéculer sur les raisons de l'inefficacité des mRNA exogènes naturels dans un système préincubé. Il est possible qu'elle résulte par exemple de la dénaturation des facteurs d'initiation de la lecture du mRNA, comparables à ceux observés dans les systèmes bactériens.

Nous avons appliqué le système microsomal mis au point, à l'étude de l'influence de l'hypophysectomie et du traitement par l'hormone de croissance sur la synthèse protéique in vitro dans le foie de rat. Quelques études de ce type, peu nombreuses, ont été effectuées simultanément au cours de l'élaboration de notre propre travail, en particulier par KORNER (1966) qui en a donné une revue générale. Un autre travail, se limitant aux effets de l'hypophysectomie, a été effectuée par STAEHELIN (1965) avec un système "ribosomal" de foie de rat. Cet auteur conclut à une diminution du mRNA dans le foie des animaux opérés, mais aussi à une moindre capacité des ribosomes de réagir avec les RNA messagers. Enfin, GARREN et coll. (1967) contestent en partie les résultats de STAEHELIN et pensent que l'hypophysectomie se répercute surtout par un effet sur la traduction au niveau des ribosomes.

Nos propres recherches, concernant l'application de cette méthode à l'étude des effets de l'hypophysectomie et de l'action de l'hormone somatotrope sur la synthèse protéique, nous ont permis de préciser un certain nombre de points à ce sujet.

Tout d'abord, l'examen au microscope électronique de coupes ultra-fines dans les culots de microsomes provenant de foies d'animaux hypophysectomisés nous a montré que les

vésicules lisses étaient plus abondantes et les ribosomes libres relativement plus nombreux que dans les culots provenant de foies d'animaux normaux. Ceci pourrait correspondre à des modifications des conditions de liaison entre les ribosomes et les membranes ergastoplasmiques, entraînant chez l'animal hypophysectomisé une association plus fragile de ces deux constituants.

La comparaison des activités endogènes des différents systèmes, nous a montré que l'hypophysectomie entraînait une diminution de l'incorporation de la ^{14}C -phénylalanine dans les protéines.

Cette diminution de l'activité endogène du système acellulaire hépatique de rats hypophysectomisés avait déjà été observée par KORNER (1964) qui l'avait attribuée tout d'abord à un déficit en RNA messenger. Mais dans nos expériences, la réponse plus faible de ce système en présence de poly U, laisse supposer un changement au niveau des ribosomes. Ces résultats confirment, par une autre voie, ceux de GARREN et coll. (1967). De plus, les expériences croisées entre microsomes et surnageant enzymatique provenant de foies de rats normaux ou hypophysectomisés ont également montré une diminution de la stimulation de l'incorporation des aminoacides par le poly U en présence du surnageant provenant de foies d'animaux hypophysectomisés. Il semble donc que le changement de la réponse au poly U soit dû à des modifications survenues à la fois au niveau des microsomes et au niveau du surnageant 105.000 g.

Nous avons constaté que l'administration d'hormone somatotrope aux rats hypophysectomisés se traduisait par une augmentation de l'incorporation endogène. Cet effet, également observé par KORNER (1964) a été interprété comme la conséquence d'une augmentation du taux de RNA messenger. Cependant, nous avons constaté une augmentation simultanée de la réponse au poly U, ce qui semble indiquer que l'hormone de croissance pourrait non seulement agir au niveau de la transcription du DNA en RNA, mais également au niveau de la traduction des RNA messagers.

Ces résultats mettant en évidence l'importance de la traduction et en particulier le rôle du surnageant 105.000g, renfermant les tRNA ainsi que les aminoacyl-tRNA synthétases,

nous ont amené à envisager la possibilité d'une action hormonale au niveau de l'une des étapes capitales de la traduction, à savoir l'activation et la fixation spécifique des aminoacides sur les tRNA directement impliqués dans le déchiffrage du code. L'arrêt ou la diminution de la synthèse des protéines dans le foie des animaux hypophysectomisés pourrait, en premier lieu, provenir de modifications dans la structure ou dans la répartition de divers tRNA. A notre connaissance, il n'existe à l'heure actuelle aucun travail traitant des relations possibles entre les tRNA et les hormones. Cependant, nous pouvons citer dans ce contexte les travaux de TAYLOR et coll. (1967, 1968) qui ont mis en évidence des différences dans les profils d'élution des tRNA de cellules tumorales par rapport aux tRNA des tissus normaux chez la souris. De même, LEE et INGRAM (1967) ont observé des différences qualitatives et quantitatives des méthionyl-tRNA durant le développement du poisson.

Dans l'optique d'une action régulatrice possible des hormones hypophysaires à ce niveau, nous avons effectué une étude comparative des tRNA de foie de rats hypophysectomisés et des tRNA de foie de rats normaux. Pour les dix aminoacides étudiés, nous avons observé avec les tRNA de foie d'animaux hypophysectomisés, une diminution du taux de fixation en présence des aminoacyl-tRNA synthétases de foie d'animaux normaux. Cette diminution est variable suivant l'acide aminé considéré. Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence de différence significative dans la répartition des tRNA spécifiques d'un même acide aminé, analysés par chromatographie en phase inversée. De ces expériences, nous pouvons conclure que l'hypophysectomie n'entraîne pas, du moins dans les cas étudiés, la disparition de l'un ou de l'autre type de tRNA. Il en découle que la diminution de la capacité acceptrice des tRNA de foie de rats hypophysectomisés vis à vis des aminoacides, serait plutôt due à des modifications mineures de la structure entraînant l'incapacité fonctionnelle d'une certaine proportion de molécules de tRNA. Il pourrait s'agir de l'absence de transformation d'un certain nombre de bases normales en bases mineures, par exemple à la suite d'une chute du taux de méthylation ou d'un empêchement de la transformation de l'uracile ou de l'uridine en ses dérivés.

Une deuxième possibilité de régulation par l'hormone de croissance pourrait se situer non pas au niveau des tRNA eux-mêmes, mais au niveau des enzymes impliqués dans l'activité des tRNA. Il pourrait s'agir d'une différence dans l'acti-

tivité des aminoacyl-tRNA synthétases. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé l'activité des tRNA de foie de rats en présence des enzymes de foies de rats normaux d'une part et hypophysectomisés d'autre part. Dans ces expériences, nous avons mis en évidence une diminution du taux de fixation des aminoacides en présence de l'enzyme préparé à partir de foie de rats hypophysectomisés. Cette observation pourrait être en faveur de la déficience de la préparation enzymatique en certains de ses constituants. Nos expériences peuvent être rapprochées de celles de STREHLER et coll. (1967) qui suggèrent qu'un changement des capacités fixatrices de certains tRNA isolés d'un même tissu au cours du développement de l'animal pouvait être dû à l'absence d'une fraction bien définie dans la préparation enzymatique. Mais il ne s'agit pas là de la seule possibilité de régulation enzymatique au niveau de l'activité des tRNA. Il pourrait également exister une régulation au niveau d'enzymes impliqués dans la transformation des bases normales du tRNA en bases mineures. Or, une des catégories d'enzymes bien étudiée dans ce type de modification est représentée par les méthylases. Des changements qualitatifs et quantitatifs dans les enzymes de méthylation des tRNA ont été décrits dans de nombreux systèmes biologiques ayant subi quelque altération des mécanismes régulateurs. En particulier, LITTAUER et coll. (1966) ont observé chez *E. coli* que la méthylation pouvait influencer les propriétés biologiques des tRNA. La fonction particulière et l'ampleur de la modification peuvent varier d'un tRNA spécifique à l'autre, et l'activité dépend du type et de la localisation des bases méthylées concernées. De leur côté, WAINFAN et coll. (1966) ont noté une augmentation du taux de méthylation des tRNA dans les tissus tumoraux chez l'homme et chez l'animal. Dans ce dernier cas, la "surméthylation" des tRNA apparaît d'une manière concomitante avec l'augmentation du métabolisme et de la multiplication cellulaire. Inversement, on pourrait imaginer qu'une "sous-méthylation" des tRNA entraîne un arrêt de la croissance chez les animaux hypophysectomisés.

Nos expériences montrent donc que la chute générale d'activité anabolique observée dans le foie des animaux hypophysectomisés peut être due à l'altération des mécanismes de traduction des RNA messagers. Elles mettent en évidence, en particulier et pour la première fois, une atteinte au niveau des RNA de transfert et des enzymes impliquées dans l'activité des tRNA. Il semble donc bien, que dans ce domaine, nous devons envisager la possibilité de l'existence de sites d'ac-

tion multiples. Il y a en effet un long chemin depuis l'information transcrite du DNA jusqu'à la formation de la protéine complète, avec de nombreux points d'articulation possibles pour la régulation hormonale. A cet égard, la cellule animale présente bien des contrastes par rapport au modèle bactérien ; la régulation pouvant intervenir à divers niveaux :

- la transcription du DNA en RNA messenger,
- la dégradation sélective de certains mRNA dans le noyau même ?
- le transport des mRNA du noyau vers le cytoplasme ?
- la stabilité des mRNA dans le cytoplasme ?
- la coupure des mRNA en chaînes polynucléotidiques de taille conforme aux protéines (mRNA polycistroniques) ?
- l'attachement des mRNA aux ribosomes (polysomes) et des ribosomes aux membranes du réticulum endoplasmique (microsomes),
- l'initiation de la lecture,
- l'activation et le transfert des aminoacides par les tRNA,
- la formation des liaisons peptidiques (complexe ribosome - mRNA-aminoacyl tRNA)
- la structuration (secondaire, tertiaire) des chaînes peptidiques naissantes,
- la formation de la protéine complète (protéines conjuguées, groupements prosthétiques).

Pour ce qui est de l'influence de l'hypophysectomie sur la synthèse des RNA et des protéines au niveau du foie, il est évidemment possible que la pluralité des effets observés résulte de l'absence de plusieurs types d'hormones. Il est probable que certains de ces effets soient imputables, de manière indirecte, à la suppression des "stimulines hypophysaires", notamment de l'ACTH et de la TSH, alors que d'autres soient directement et uniquement en relation avec l'absence de l'hormone somatotrope. Mais il n'est pas exclu qu'une même hormone puisse agir à la fois en divers endroits sur le mécanisme de la biosynthèse des protéines, par exemple comme dérépresseur de la transcription et comme inhibiteur d'un répresseur cytoplasmique de traduction.

Nous sommes ainsi placé devant un problème extrêmement complexe. Il ne semble pas que l'on puisse retenir à la lumière de ces données l'existence à l'échelle cellulaire d'un mode d'action commun des hormones au seul niveau de la transcription du code génétique, et illustrer une fois de plus le concept pourtant bien séduisant de la généralisation et de l'unité des mécanismes qui président au fonctionnement des organismes vivants.

R E S U M E

Ce travail est consacré à l'étude des acides ribonucléiques de la cellule hépatique du rat, dans l'optique de la compréhension à l'échelle cellulaire et moléculaire du mécanisme de contrôle hormonal hypophysaire de la synthèse protéique dans le foie. Les investigations ont été effectuées dans le cadre de l'hypothèse d'une action primaire de l'hormone de croissance au niveau de la transcription du code génétique. Mais nos recherches nous ont également conduit à étudier une action possible au niveau de la traduction des RNA messagers.

1. - Dans une première partie de notre travail, nous avons étudié la répercussion de l'hypophysectomie sur le métabolisme des acides ribonucléiques cytoplasmiques et nucléaires du foie de rat, en utilisant les méthodes de marquage isotopique. Nous nous sommes particulièrement intéressé aux RNA nucléaires à marquage rapide, cette propriété ayant été proposée comme l'un des critères des RNA messagers. Nous avons à cet effet mis au point ou adapté à nos besoins un certain nombre de techniques de fractionnement cellulaire et de purification des constituants subcellulaires. Les méthodes d'isolement et de purification des noyaux que nous avons employées sont dérivées d'une part de la méthode de CHAUVEAU utilisant la centrifugation en milieu de saccharose hypertonique, et, d'autre part de la méthode de ZALTA basée sur l'emploi d'agents tensioactifs. Cette dernière méthode nous a permis d'obtenir des noyaux hépatiques d'une grande pureté, comme en témoigne l'examen des culots nucléaires au microscope électronique. De plus nous avons observé que ces noyaux conservaient in vitro, certaines capacités fonctionnelles, notamment celle de la protéosynthèse.

Nous avons ensuite extrait les RNA nucléaires à l'état pratiquement pur et nous avons déterminé les variations quantitatives et les vitesses de renouvellement de ces RNA chez les animaux hypophysectomisés par rapport aux animaux normaux. Nous avons comparativement utilisé et adapté au tissu hépatique trois techniques d'extraction différentes: la première dérivée de la technique de MONIER, dans laquelle les RNA sont extraits à froid (2°C), la deuxième dérivée de celle de SPORN et DINGMAN opérant à 20°C et la troisième dérivée de la technique d'extraction phénolique

à chaud (63°C) de SCHERRER et DARNELL. Les RNA ont été analysés par ultracentrifugation dans des gradients de concentration de saccharose en comparant les profils d'absorption dans l'ultraviolet à 260 mμ et les profils de radioactivité ^{32}P ou ^{14}C des diverses préparations.

L'étude des RNA nucléaires par les méthodes précédentes nous a conduit à soulever le problème de l'existence des RNA ribosomiques et de transfert dans les noyaux, sous les formes rencontrées dans le cytoplasme. Lorsque le matériel de départ est constitué par des noyaux très purs débarrassés de toute contamination cytoplasmique, en particulier de la couronne ergastoplasmique périnucléaire, nous avons en effet noté l'absence des RNA ribosomiques et de transfert dans les extraits. Il apparaît dans ces conditions un seul type de RNA, uniformément marqué, à activité spécifique élevée et présentant une constante de sédimentation d'environ 13 S. Nous ne pouvons écarter entièrement la possibilité que ce constituant 13 S résulte d'une dégradation éventuelle de RNA de poids moléculaires plus élevés, ni la possibilité de perte par diffusion de certains RNA au cours de la purification des noyaux. Cependant la préparation de noyaux hépatiques en milieu organique par la technique de SIEBERT, évitant la diffusion et minimisant les risques de dégradation éventuelle des constituants intranucléaires hydrosolubles, a aussi conduit à l'obtention de ce même constituant.

Lorsque les RNA sont extraits à partir de noyaux imparfaitement purifiés contenant encore des contaminants cytoplasmiques, des valeurs variables des constantes de sédimentation de ces RNA à marquage rapide sont observées. Nous avons étudié toute une série de facteurs d'ordre méthodologique pouvant influencer les caractéristiques de sédimentation de ces RNA. Nous avons ainsi mis en évidence des possibilités d'interaction ou d'agrégation de ces RNA avec les constituants 28 S et 18 S du RNA ribosomal, pouvant expliquer en partie l'extrême diversité des résultats rencontrés dans la littérature au sujet de la taille de ces RNA.

L'application de ces méthodes à l'étude des RNA contenus dans la cellule hépatique des rats hypophysectomisés nous a permis d'observer une diminution générale du taux des RNA, en particulier du RNA ribosomal. Ce résultat est en accord avec les études réalisées au microscope électronique qui montrent une raréfaction des ribosomes dans le cytoplasme des hépatocytes. Dans le noyau, nous avons

observé un ralentissement de la synthèse des RNA à marquage rapide, mais sans modification des profils de sédimentation.

2. - Dans une étape suivante, nous nous sommes adressé à un autre critère des RNA messagers, celui de la stimulation de la synthèse protéique *in vitro* dans un système acellulaire. Nous avons mis au point un système acellulaire microsomal de foie de rat pour lequel nous avons défini les conditions optimales de fonctionnement. Nous avons étudié l'activité d'incorporation des aminoacides dans les protéines de ce système, en présence de polyribonucléotides de synthèse (poly U, poly CU et poly AUC) et en présence des RNA messagers endogènes et de RNA messagers naturels exogènes. Ce système nous a permis d'obtenir d'une manière reproductible une incorporation élevée des aminoacides dans les protéines en présence du RNA messenger endogène, et, après inactivation de ce dernier par préincubation, une forte stimulation de l'incorporation de la ^{14}C phénylalanine en présence d'acide polyuridylique.

L'étude des effets de l'hypophysectomie nous a montré que l'incorporation des aminoacides dans les protéines par les microsomes est diminuée de 50 à 60 p.100 par rapport aux témoins. L'injection sous-cutanée d'hormone somatotrope aux rats hypophysectomisés permet de restaurer partiellement l'activité d'incorporation des aminoacides. Ce résultat pourrait être interprété dans le sens d'une diminution du taux de RNA messenger dans les cellules hépatiques des animaux hypophysectomisés et être en faveur d'un contrôle de la synthèse protéique chez les mammifères par l'hormone somatotrope au niveau de la transcription. Mais des expériences croisées entre les microsomes et les fractions enzymatiques provenant de foies d'animaux normaux, d'animaux hypophysectomisés ou hypophysectomisés et traités à l'hormone de croissance, en présence de RNA messenger endogène ou de poly U, semblent montrer qu'il y a aussi une action au niveau de la traduction des RNA messagers.

3. - Cet effet pouvant se localiser à différents niveaux (ribosomes, acides ribonucléiques de transfert, enzymes d'activation et de transfert), nous avons étudié dans la deuxième partie de notre travail, l'influence éventuelle de l'hypophysectomie sur une catégorie de RNA jouant un rôle capital dans le mécanisme de la synthèse

protéique, à savoir les RNA de transfert (tRNA) dont l'anticodon est directement impliqué dans le déchiffrement du code.

L'arrêt de la production de certaines protéines ou la diminution de leur synthèse dans le foie des animaux hypophysectomisés pourrait provenir de modifications dans la structure ou dans la répartition de divers tRNA. Pour apporter une réponse à ce problème, nous avons comparé la capacité acceptrice vis-à-vis de divers aminoacides des tRNA préparés à partir de foie de rats normaux et celle des tRNA extraits de foies de rats hypophysectomisés, en présence d'une préparation enzymatique provenant de foie d'animaux normaux. Ces tRNA ont été préparés selon trois techniques différentes, qui nous ont permis d'obtenir le tRNA total, le tRNA libre préparé à partir de surnageant 105 000g ou encore le tRNA préparé à partir de surnageant cytoplasmique comprenant à la fois le tRNA libre et celui associé aux ribosomes.

Pour les tRNA de foie d'animaux hypophysectomisés, nous avons observé une diminution de la capacité acceptrice par rapport aux tRNA de foie d'animaux normaux. Ce phénomène apparaît aussi bien avec le tRNA lié aux microsomes qu'avec le tRNA libre. La diminution du taux de fixation est variable suivant l'acide aminé considéré. Nous avons vérifié que les différences observées n'étaient pas dues à un artefact en étudiant comparativement l'influence sur la capacité acceptrice des tRNA de foie de rats normaux et hypophysectomisés, de divers facteurs (préparation des RNA, conditions optimales de fixation, cinétique, pH, concentration en Mg^{++} et en ATP, présence ou absence de CTP, test de renaturation de la structure tertiaire). Ce résultat pourrait signifier que l'hypophysectomie entraîne au niveau de certains tRNA une altération du site de reconnaissance de l'aminoacyl-tRNA-synthétase.

Une telle altération pourrait se répercuter sur la répartition des divers tRNA spécifiques d'un même acide aminé. Pour vérifier cette possibilité, nous avons effectué un fractionnement par chromatographie sur colonne en phase inversée selon la technique décrite par WEISS et KELMERS. Nous avons chromatographié simultanément sur une même colonne de Chromosorb, les tRNA de foie de rats hypophysectomisés chargés par des aminoacides marqués au ^{14}C et les tRNA de foie de rats normaux chargés par des

aminoacides marqués au ^3H . Quoique le pouvoir de résolution de la méthode employée soit très élevé, nous n'avons pas pu mettre en évidence pour les aminoacyl-tRNA étudiés, de différences importantes entre la répartition des divers pics correspondant au tRNA de foie d'animaux normaux et à celui de foie d'animaux hypophysectomisés. Dans le cas de la valine qui est un aminoacide pour lequel la capacité acceptrice du tRNA de foie de rats hypophysectomisés est fortement diminuée (de 46p.100), on assiste seulement à la disparition d'un pic mineur.

Il ressort de cette étude que la diminution de la capacité acceptrice des tRNA extraits de foie de rats hypophysectomisés n'est pas due à l'atteinte spécifique d'un tRNA particulier, mais plutôt à une modification touchant tous les tRNA. L'altération de la structure d'une certaine proportion des tRNA pourrait expliquer la diminution de l'incorporation des aminoacides dans les protéines, observée dans les **systèmes** acellulaires préparés à partir de foies d'animaux hypophysectomisés. La diminution de l'incorporation pourrait ainsi résulter non seulement d'une action au niveau de la transcription, mais aussi d'un effet sur la traduction à la fois au niveau du site de synthèse proprement dit, le ribosome, et au niveau des RNA de transfert et des enzymes d'activation nécessaires à la formation des aminoacyl-tRNA. Des modifications mineures intervenant sur les tRNA et placées sous contrôle hormonal pourraient ainsi constituer le point de départ d'un autre mécanisme de régulation du fonctionnement cellulaire et de la croissance.



- A D D E N D A -

Une synthèse succincte de ce travail permet de dégager les points essentiels suivants.

De nombreuses données ont été élaborées concernant l'application des méthodes récentes de la Biologie Moléculaire à l'étude des mécanismes de la biosynthèse des protéines chez les mammifères. Plusieurs techniques complexes, comme celles du fractionnement et de la purification des constituants subcellulaires, du marquage isotopique, de l'extraction et de l'analyse des RNA nucléaires et cytoplasmiques, de l'étude de la synthèse protéique "in vitro" dans un système acellulaire, de la préparation et de l'étude des propriétés des RNA de transfert, ont été mises au point ou adaptées aux tissus animaux. Nous avons appliqué ces méthodes nouvelles à l'étude de problèmes physiologiques, en l'occurrence celui de l'influence de l'hypophyse sur la synthèse protéique au niveau du foie de rat.

Il a ainsi pu être montré qu'en l'absence des hormones hypophysaires le taux de RNA cytoplasmique est diminué de 40 p.100 environ dans le foie.

Dans les noyaux obtenus à l'état hautement purifié, on observe un ralentissement de la synthèse des RNA se traduisant par la diminution de la vitesse d'incorporation des précurseurs radioactifs dans les RNA à marquage rapide. Une étude critique des caractéristiques moléculaires des RNA nucléaires a montré que celles-ci variaient considérablement en fonction de facteurs méthodologiques de préparation et d'analyse de ces macromolécules pouvant entraîner des erreurs d'interprétation importantes, notamment au sujet des RNA messagers.

Des expériences d'incorporation des aminoacides dans les protéines "in vitro" indiquent que le taux de synthèse est diminué de 50 p.100 dans les systèmes acellulaires de foie de rats hypophysectomisés par rapport à ceux de rats normaux. Le traitement des rats opérés par l'hormone somatotrope, restaure en partie cette déficience.

Ce fait pourrait s'interpréter par une diminution du taux de RNA messenger dans le foie de rats hypophysectomisés. Mais des expériences croisées ont également mis en évidence une altération au niveau des ribosomes,

car ces derniers sont moins actifs en présence de polyU.

De plus nous avons observé des modifications au niveau des préparations enzymatiques utilisées. Ces modifications sont dues d'une part à une moindre capacité de fixation des aminoacides par les tRNA et d'autre part à une diminution d'activité des aminoacyl-tRNA synthétases.

Une étude ultrastructurale au microscope électronique nous a montré des changements dans les rapports "ribosomes-membranes" du réticulum endoplasmique. Dans les préparations microsomales, les vésicules lisses sont plus abondantes et les ribosomes libres plus nombreux. Les structures polysomales persistent néanmoins dans le foie des animaux hypophysectomisés.

Il apparaît donc que le contrôle hypophysaire s'exerce au niveau du foie par des actions multiples, interférant notamment sur la traduction du code génétique, et il ne semble pas que l'on puisse retenir dans ce cas l'hypothèse d'une action unique au niveau de la transcription du DNA en RNA messenger.

BIBLIOGRAPHIE

- AARONSON, S.A., KORNER, A. et MUNRO, A.J., (1966), *Biochem.J.*, 101, 448.
- APGAR, J. et HOLLEY, R.W., (1962), *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 8, 391.
- APGAR, J. et HOLLEY, R.W., (1964), *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 16, 121.
- AUBEL-SADRON, G., BECK, G. et EBEL, J.P., (1961), *Biochim.Biophys. Acta*, 53, 11.
- BAUTZ, E., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., (1963), 28, 205.
- BECK, J.P., GUERNE, J.M., SCHMITT, G., STUTINSKY, F. et EBEL, J.P., *C.R.Acad.Sc.*, (1968), 266, 940.
- BECK, G., BECK, J.P. et EBEL, J.P., (1968), *Bull.Soc.Chim.Biol.*, sous presse.
- BEHRENS, M., *Z.Physiol.Chem.*, (1932), 209, 59.
- BLOEMENDAL, H., BONT, W.S., De VRIES, M. et BENEDETTI, E.L., (1967) *Biochem.J.*, 103, 177.
- BRAMWELL, M.E. et HARRIS, H., (1967), *Biochem.J.*, 103, 816.
- BRAWERMAN, G., GOLD, L. et EISENSTADT, J., (1963), *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.*, 50, 630.
- BRAWERMAN, G., BIEZUNSKI, N. et EISENSTADT, J., (1965), *Biochim. Biophys.Acta*, 103, 201.
- BURTON, K., (1956), *Biochem.J.*, 62, 315.
- CAMPBELL, P.N., COOPER, C. et HICKS, M., (1964), *Biochem.J.*, 92, 225.
- CHAMBERLIN, M. et BERG, P., (1964), *J.Mol.Biol.*, 8, 297.
- CHANTRENNE, H., BURNY, A. et MARBAIX, G., (1967), *Progress in Nucleic Acid Research*, Acad.Press, 7, 173.
- CHAUVEAU, J., MOULE, J. et ROUILLER, C., (1956), *Exp.Cell Research*, 11, 317.
- CHENG, P.Y., (1961), *Biochim.Biophys.Acta*, 53, 235.
- CHERAYIL, J.D. et BOCK, R.M., (1965), *Biochem.*, 4, 1174.
- CLARK, J., CHANG, A., SPIEGELMAN, S. et REICHMANN, M., (1965), *Proc. Natl.Acad.Sc.U.S.*, 54, 1193.
- CLEVER, U. et KARLSON, P., (1960), *Exp.Cell Res.*, 20, 623.
- COOLSMA, J.M., CAMPAGNE, R.N. et GRUBER, M., (1963), *Biochim.Biophys. Acta*, 72, 494.
- CRAWLEY, J.C.W. et HARRIS, H., (1963), *Exp.Cell Res.*, 31, 70.
- DELIHAS, N. et STAEHELIN, M., (1966), *Biochim.Biophys.Acta*, 119, 385.
- DIGIROLAMO, A., HENSHAW, E.C. et HIATT, H.H., (1964), *J.Mol.Biol.*, 8, 479.
- DIGIROLAMO, A. et DIGIROLAMO, M., (1966), *Biochim.Biophys.Acta*, 114, 195.

- DIGIROLAMO, A., DIGIROLAMO, M., GAETANI, S. et SPADONI, M.A., (1967), European J. Biochem., 1, 164.
- DIRHEIMER, G., WEIL, J.H. et EBEL, J.P., (1962), Compt. Rend. Acad. Sci., 255, 2312.
- DIRHEIMER, G. et EBEL, J.P., (1967), Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 1679.
- DOCTOR, B.P., APGAR, J. et HOLLEY, R.W., (1961), J. Biol. Chem., 236, 1117.
- DOUNCE, A.L., (1948), Ann. New York Acad. Sc., 50, 982.
- DUKES, P.P., SEKERIS, C.E. et SCHMID, W., (1966), Biochim. Biophys. Acta, 126, 123.
- EHRENSTEIN, (von) et LIPMANN, F., (1961), Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 47, 941.
- ELAEV, N.R. et RYKHLIK, I., (1963), Biokhimiya, 28, 1047.
- FESSENDEN, J.M. et MOLDAVE, K., (1962), Biochem., 1, 485.
- FEIGELSON, M., GROSS, P.R. et FEIGELSON, P., (1962), Biochim. Biophys. Acta, 55, 495.
- FUJITA, S. et TAKAMOTO, K., (1963), Nature, 200, 494.
- GARTLAND, J. et SUEOKA, N., (1966), Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 55, 948.
- GARREN, L.D., RICHARDSON, A.P. et CROCCO, R.M., (1967), J. Biol. Chem., 242, 650.
- GEORGIEV, G.P. et MANTIEVA, V.L., (1962), Biochim. Biophys. Acta, 61, 153.
- GEORGIEV, G.P., SAMARINA, O.P., LERMAN, M.I. et SMIRNOV, M.N., (1963), Nature, 200, 1291.
- GEORGIEV, G.P., (1966), Progress in Nucleic Acid Research, Acad. Press, 6, 259.
- GIEGE, R. et EBEL, J.P., (1968), Biochim. Biophys. Acta, 161, 125.
- GLEBOV, R.N., ZAITSEVA, G.N. et BELOZERSKII, A.N., (1965), Biokhimiya, 30, 506. (Edit. anglaise).
- GOLDSTEIN, J., BENNETT, T.P. et CRAIG, L.C., (1964), Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 51, 119.
- GRIFFIN, A., CANNING, L., HOLLAND, E. et MALLICK, B., (1965), Canc. Res. 25, 318.
- GROS, F., GILBERT, W., HIATT, H., ATTARDI, G., SPAHR, P.S. et WATSON, J.D., (1961a), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26, 111.
- GROS, F., HIATT, H., GILBERT, W., KURLAND, G., RISEBROUGH, R.N. et WATSON, J.D., (1961b), Nature, 190, 581.
- GROS, F., NAONO, S., WOESE, C., WILLSON, C. et ATTARDI, G., (1963), "Informational Macromolecules", Acad. Press, p. 387.
- GROSSPELIUS, Y. et ORRENIUS, S., (1967), F.E.D.S. Abstracts, Oslo, p. 106.
- GRUNBERG-MANAGO, M. et GROS, F., (1964), Bull. Soc. Chim. Biol., 46, 1441.
- GRUNBERG-MANAGO, M. et DONDON, J., (1965), Biochem. Biophys. Res. Comm., 18, 517.

- HADJIOLOV, A.A., VENKOV, F.V. et TSANEV, R.G., (1966), *Anal. Biochem.*, 17, 263.
- HADJIVASSILIOU, A. et BRAWERMAN, G., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, 103, 211.
- HADJIVASSILIOU, A. et BRAWERMAN, G., (1967), *Biochem.*, 6, 1934.
- HANKING, B.M. et ROBERTS, S., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, 104, 427.
- HAREL, J., HAREL, L., LACOUR, F., BOER, A. et IMBENOTTE, J., (1963), *J. Mol. Biol.*, 7, 645.
- HARRIS, H., FISHER, H.W., RODGERS, A.L., SPENCER, T. et WATTS, J.W., (1963), *Proc. Roy. Soc. B.*, 157, 177.
- HARSHAW, J.P., BROWN, R.A. et GRAHAM, A.F., (1962), *Anal. Biochem.*, 4, 182.
- HENSHAW, E.C., BOJARSKI, T.B. et HIATT, H.H., (1963), *J. Mol. Biol.*, 7, 122.
- HEYMAN, D., SEROR, S., DESSEAUX, B. et LEGAULT-DEMARE, J., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 145, 596.
- HIATT, H.H., (1962), *J. Mol. Biol.*, 5, 217.
- HIGASHI, K. et BUSCH, H., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, 103, 339.
- HISHIZAWA, T. et TERAYAMA, H., (1964), *Biochem. J.*, 59, 279.
- HOAGLAND, M.B., KELLER, E.B. et ZAMECNIK, P.C., (1956), *J. Biol. Chem.*, 218, 345.
- HOGEBOM, G.H., SCHNEIDER, W.C. et PALLADE, G.E., (1948a), *J. Biol. Chem.*, 172, 619.
- HOGEBOM, G.H., SCHNEIDER, W.C. et PALLADE, G.E., (1948b), *J. Biol. Chem.*, 196, 111.
- HOLLEY, R.W., APGAR, J., DOCTOR, J., FARROW, B.P., MARINI, J. et MERRIL, S.A., (1961), *J. Biol. Chem.*, 236, 200.
- JACOB, F. et MONOD, J., (1961), *J. Mol. Biol.*, 3, 318.
- JUNGBLUT, P.W., HATZEL, I., DESOMBRE, E.R. et JENSEN, E.V., (1967), *18^{ème} Colloq. Gessell. Physiol. Chem., Mosbach, Springer Ver.* p. 58.
- KANEKO, I. et DOI, R.H., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 55, 564.
- KARLSON, P., (1963), *Perspect. Biol. Med.*, 6, 203.
- KATO, R., LOEB, L. et GELBOIN, H.V., (1965), *Nature*, 205, 668.
- KELLER, P.C. et ZAMECNIK, E.B., (1954), *J. Biol. Chem.*, 209, 337.
- KELMERS, A.D., NOVELLI, G.D. et STULBERG, M.P., (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 3979.
- KENNEY, F.T. et KULL, F.J., (1963), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 50, 493.
- KIDSON, C., KIRBY, K.S. et RALPH, R.K., (1963), *J. Mol. Biol.*, 7, 312.
- KING, H.W., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, 134, 194.
- KIRBY, K.S., (1956), *Biochem. J.*, 64, 405.
- KORNER, A., (1961), *Biochem. J.*, 81, 168.
- KORNER, A. et MUNRO, A.J., (1963), *Nature*, 199, 489.
- KORNER, A., (1965), *Fed. Proc. Horm. Res.*, 21, 205.
- KORNER, A. et GUMBLEY, J.M., (1966), *Nature*, 209, 505.
- KRANTZ, S. et PAUL, J., (1965), *F.E.B.S. Abstracts*, Vienne, p. 286.
- KRUH, J., DREYFUS, J.C. et SHAPIRA, G., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, 114, 371.

- LEE, J.C. et INGRAM, V.M., (1967), *Sciences*, 158, 1330.
- LIAO, S. et WILLIAMS-ASHMAN, A.G., (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 48, 1956.
- LINDAHL, T., ADAMS, A. et FRESCO, J.R., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 55, 941.
- LINDAHL, T., ADAMS, A., GEROCH, M. et FRESCO, J.R., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 57, 178.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J. et RANDALL, R., (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
- MANS, R.J. et NOVELLI, G.D., (1961), *Arch. Biochem. Biophys.*, 94, 48.
- MAGGIO, R., SIEKEWITZ, P. et PALLADE, G.E., (1963), *J. Cell. Biol.*, 18, 267.
- MAXWELL, E.S., (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 48, 1639.
- MCCARTHY, K., PARSONS, J., CARTER, W. et LASZLO, J., (1966), *J. Biol. Chem.*, 241, 5489.
- MEJBAUM, W., (1939), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 258, 117.
- MESELSON, M., STAHL, F.W. et WINOGRAD, J., (1957), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 43, 581.
- MIALHE-VOLOSS, C., BECK, J.P., GUERNE, J.M., SCHMITT, G. et STUTINSKY, F., (1966), *C.R. Acad. Sci.*, 262, 293.
- MIRSKY, A.E. et POLLISTER, A.W., (1946), *J. Gen. Physiol.*, 30, 101.
- MONIER, R., (1962a), *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 1001.
- MONIER, R., NAONO, S., HAYES, D., HAYES, F. et GROS, F., (1962b), *J. Mol. Biol.*, 5, 311.
- MOULE, Y., (1953), *Arch. Sci. Physiol.*, 7, 161.
- MOULE, Y. et CHAUVEAU, J., (1959), *Exp. Cell Research*, suppl. 7, 156.
- MUELLER, G.C., GORSKI, J. et AIZAWA, Y., (1961), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 47, 164.
- MUENCH, K.N. et BERG, P., (1966a), *Biochemistry*, 5, 970.
- MUENCH, K.N. et BERG, P., (1966b), *Biochemistry*, 5, 982.
- MUNRO, A.J. et KORNER, A., (1962), *Biochem. J.*, 85, 37p.
- MURAMATSU, M. et BUSCH, H., (1965), *J. Biol. Chem.*, 240, 3960.
- MURAMATSU, M., HODNETT, J.L. et BUSCH, H., (1966), *J. Biol. Chem.*, 241, 1544.
- NIRENBERG, M.W. et MATTHAEI, J.H., (1961), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 47, 1588.
- NOVELLI, G.D., (1967), *Annual Reviews*, Palo Alto, Calif., 36, 499.
- PARTHIER, B., (1967), *F.E.B.S. Abstracts*, Oslo, p. 84.
- PERRY, R.P., (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 48, 2179.
- PETERMANN, M.L., (1964), "The Physical and Chemical Properties of Ribosomes", Elsevier, Amsterdam.
- PHILIPSON, L., (1961), *J. Gen. Physiol.*, 44, 899.
- POGO, A.O., POGO, B.G.T., LITTAU, U.C., ALFFREY, V.G., MIRSKY, A.E. et HAMILTON, M.G., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 849.
- RENDI, R., (1960), *Exp. Cell Res.*, 19, 489.
- REVEL, M. et HIATT, H.H., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 17, 730.
- REVEL, M. et GROS, F., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 25, 124.

- ROZENCWAJG-LAHALLE, R. et ZALTA, J.P., (1965), C.R. Acad. Sci., 261, 5701.
- SARIN, P. et ZAMECNIK, D., (1964), Biochim. Biophys. Acta, 91, 653.
- SCHERRER, K. et DARNELL, J.E., (1962), Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 486.
- SCHERRER, K., MARCAUD, L., ZAJDELA, F., BRECKENRIDGE, E. et GROS, F., (1966a), Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 1037.
- SCHERRER, K., MARCAUD, L., ZAJDELA, F., LONDON, I.M. et GROS, F., (1966b), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 56, 1571.
- SCHMIDT, G. et TANNHAUSER, S.J., (1945), J. Biol. Chem., 83, 161.
- SCHMITT, G., BECK, J.P., GUERNE, J.M., STUTINSKY, F. et EBEL, J.P., (1968), Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 21.
- SCHNEIDER, W.C., (1945), J. Biol. Chem., 161, 293.
- SCORNIK, O.A., HOAGLAND, M.B., PFEFFERKORN, L.C. et BISHOP, E.A., (1967), J. Biol. Chem., 242, 131.
- SEKERI, K.E. et SEKERIS, C.E., (1967), F.E.B.S. Abstracts, Oslo, p. 43.
- SEKERIS, C.E., (1967), 18^{ème} Colloq. Gessell. Physiol. Chem., Mosbach, Springer Ver., p. 126.
- SIEBERT, G., (1964), Biochem. Taschenbuch, (2^e édit. Springer Verlag, 2, 545.
- SIEBERT, G., EBEL, J.P., WEIL, J.H. et BECK, J.P., (1965), Advances in Enzymology, Intersci. Publ., 27, 260.
- SINGER, M.F., JONES, O.W. et NIERENBERG, M.W., (1963), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 49, 392.
- SPIEGELMAN, S. et HAYASHI, M., (1963), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 28, 161.
- SPORN, M.B. et DINGMANN, N., (1963), Biochim. Biophys. Acta, 68, 387.
- STAEHELIN, M., (1965), Biochem. Zeitschrift, 342, 459.
- STEELE, W.J., OKAMURA, N. et BUSCH, H., (1965), J. Biol. Chem., 240, 1742.
- STONEBURG, C.A., (1939), J. Biol. Chem., 129, 189.
- STREHLER, B.L., HENDLEY, D.D. et HIRSCH, G.P., (1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 1751.
- SUEOKA, N. et KANO-SUEOKA, T., (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 52, 1535.
- TATA, J.R., ERNSTER, L., LINDBERG, O., ARRHENIUS, E., PEDERSEN, S. et HEDMAN, R., (1963), Biochem. J., 86, 408.
- TATA, J.R., (1967), Nature, 213, 566.
- TAKANAMI, M. et OKAMOTO, T., (1963), J. Mol. Biol., 7, 323.
- TALWAR, G.P., GUPTA, S.L. et GROS, F., (1964), Biochem. J., 91, 565.
- TAYLOR, M.W., GRANGER, G.A., BUCK, C.A. et HOLLAND, J.J., (1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 1712.
- TAYLOR, M.W., BUCK, C.A., GRANGER, G.A. et HOLLAND, J.J., (1968), J. Mol. Biol., 33, 809.
- THIEBE, R. et ZACHAU, H.C., (1965), Biochim. Biophys. Acta, 103, 568.
- TRAKATELLIS, A.C., AXELROD, A.E. et MONTJAR, M., (1964), Nature, 203, 1134.
- TSANEV, R.G., MARKOV, G.G. et DESSEV, G.N., (1966), Biochem. J., 100, 204.
- WADE, H.E., LOVETT, S. et ROBINSON, H.K., (1964), Biochem. J., 93, 121.
- WAGLE, S.R., (1963), Arch. of Biochem. and Biophys., 102, 373.

- WAGNER, E., KATZ, L. et PENMAN, S., (1967), Biochem. Biophys. Res. Comm., 28, 152.
- WAINFAN, E., SRINIVASAN, P. R. et BOREK, E., (1966), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 31, 525.
- WATERS, L. C. et NOVELLI, D., (1967), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 57, 979.
- WATTS, J. W., (1964), Biochem. J., 93, 297.
- WEINSTEIN, I. et SCHECHTER, A. N., (1962), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 48, 1686.
- WEISS, J. F. et KELMERS, A. D., (1967), Biochemistry, 6, 2507.
- WEKSLER, M. E. et GELBOIN, H. V., (1967), J. Biol. Chem., 242, 727.
- WELLING, W., BOOTSMA, D., van MUISWINKEL, E. et BERGHEGEN, C. A. P., (1965) Biochim. Biophys. Acta, 95, 262.
- WILHELMI, A. E., FISHMAN, J. B. et RUSSEL, J. A., (1948), J. Biol. Chem., 176, 735.
- WINKELMANS, D., HILL, M. et ERRERA, M., (1964), Biochim. Biophys. Acta, 80, 52.
- WINTZERITH, M., (1965), Thèse Doct. Sci., Strasbourg, n° 306.
- YANG, W. K. et NOVELLI, G. D., (1968), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 59, 208.
- YANG, S. S. et COMB, D. G., (1968), J. Mol. Biol., 31, 139.
- YOSHIKAWA-FUKUDA, M., FUKUDA, T. et KAWADE, Y., (1965), Biochim. Biophys. Acta, 103, 383.
- ZALTA, J. P., ROSENCWAJG, R. et FAVARD, P., (1962), C. R. Acad. Sci., 255, 412.
- ZALTA, J. P., HUBERT, M. T., FAVARD, P., CARRASO, M. et ROSENCWAJG, R., (1962) J. Microscopie, 1, 435.

ABREVIATIONS

sRNA	Acide ribonucléique soluble
tRNA	Acide ribonucléique de transfert
rRNA	Acide ribonucléique ribosomal
mRNA	Acide ribonucléique messenger
DNA	Acide désoxyribonucléique
RNase	R ibonucléase
DNase	Désoxyribonucléase
PolyA	Acide polyadénylique
Poly U	Acide polyuridylique
Poly CU	Acide polycytidylique - uridylique
Poly AUC	Acide polyadénylique - uridylique - cytidylique
ATP	Adénosine - triphosphate
GTP	Guanosine - triphosphate
PEP	Phosphoénolpyruvate
PK	Pyruvate - kinase
EDTA	Acide éthylène - diamine - tétra - acétique
PAS	Acide périodique - Schiff
PVS	Polyvinylsulfate de potassium
SDS	Dodécylsulfate de sodium
TCA	Acide trichloracétique
DOC	Désoxycholate de sodium
STH	Hormone somatotrope
TSH	Hormone thyroïdienne
ACTH	Hormone corticotrope
CPM	Nombre d'impulsions par minute
μM, mM	Micromole, millimole
πg	Picogramme
S	Constante de sédimentation (unités SVEDBERG)
aa	Aminoacide

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION GENERALE	1
CHOIX ET CONDITIONNEMENT DES ANIMAUX	7
PREMIERE PARTIE	
RECHERCHES SUR LES RNA MESSAGERS CYTOPLASMIQUES ET NUCLEAIRES DU FOIE DE RATS NORMAUX ET HYPOPHY- SECTOMISES	8
INTRODUCTION : Etat actuel du problème des critères du RNA messenger	8
A. PREPARATION ET ANALYSE DES RNA A MARQUAGE RAPIDE CYTOPLASMIQUE ET NUCLEAIRE	12
CHAPITRE I :	
PREPARATION DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES	12
1. Préparation de la fraction cytoplasmique et de la fraction nucléaire brute	12
2. Préparation de noyaux purifiés	14
a) Méthode de CHAUVEAU modifiée	15
(α) Description technique	15
(β) Contrôle de pureté au microscope électronique	17
b) Méthode de ZALTA modifiée	17
(α) Description technique	17
(β) Contrôle au microscope électro- nique	19
c) Contrôle de la capacité fonctionnelle et détermination du contenu en acides nuclé- iques des noyaux purifiés	20

	Page
CHAPITRE II :	
METHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES RNA DE FOIE DE RAT	22
1. Méthodes d'extraction	22
a) Méthode dérivée de celle de MONIER et coll.	22
b) Méthode dérivée de celle de SPORN et DINGMAN	23
c) Méthode dérivée de celle de SCHERRER et DARNELL	23
2. Analyse des RNA par centrifugation en gradient de concentration de saccharose	24
CHAPITRE III :	
APPLICATION DES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION DES RNA A LA FRACTION CYTOPLASMIQUE : ETUDE DU RNA CYTOPLASMIQUE A MARQUAGE RAPIDE DU FOIE DE RATS NORMAUX OU HYPOPHYSECTOMISES	25
Discussion	27
CHAPITRE IV :	
APPLICATION DES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION DES RNA A LA FRACTION NUCLEAIRE : ETUDE DES RNA NUCLEAIRES A MARQUAGE RAPIDE DU FOIE DE RATS NORMAUX OU HYPOPHYSECTOMISES	29
1. Problèmes méthodologiques	29
a) Problème de l'élimination du DNA	29
b) Comparaison de la méthode de SPORN et DINGMAN et de la méthode de SCHERRER et DARNELL	30
(α) Importance de la température d'ex- traction	30
(β) Importance du volume de tampon d'extraction	32

	Page
2. Etude du RNA nucléaire de foie de rats normaux	32
a) Culots nucléaires bruts	32
(α) Méthode d'extraction de MONIER et coll.	32
(β) Méthode d'extraction de SPORN et DINGMAN	33
(γ) Méthode d'extraction de SCHERRER et DARNELL	33
b) Noyaux préparés par la méthode de CHAUVEAU et coll.	35
(α) Méthode d'extraction de MONIER et coll.	35
(β) Méthode d'extraction de SPORN et DINGMAN	35
(γ) Méthode d'extraction de SCHERRER et DARNELL	37
c) Noyaux préparés par la méthode de ZALTA et coll.	37
(α) Méthode d'extraction de MONIER et coll.	37
(β) Méthode d'extraction de SPORN et DINGMAN	37
(γ) Méthode d'extraction de SCHERRER et DARNELL	37
3. Etude du RNA nucléaire de foie de rats hypophysectomisés	39
Discussion	39

CHAPITRE V :

PROBLEMES POSES PAR LES RNA NUCLEAIRES	41
1. Problème de la présence de RNA ribosomal et de RNA de transfert dans le noyau	41

	Page
2. Problèmes posés par les RNA nucléaires à marquage rapide	46
3. Influence de divers facteurs susceptibles d'intervenir dans la configuration des RNA à marquage rapide	51
a) Conditions physiologiques lors du prélèvement des foies	51
(α) Anesthésie des rats	51
(β) Perfusion des foies	51
(γ) Conservation des foies après le prélèvement	52
b) Facteurs intervenant dans la préparation des fractions nucléaires : répercussions de la modification de certaines conditions de la technique de ZALTA	53
c) Facteurs intervenant dans la préparation des RNA	54
(α) Influence du tampon de dispersion et de lyse des noyaux	54
(β) Influence du type d'homogénéiseur employé au cours de la lyse des noyaux	54
(γ) Rôle de la reprecipitation alcoolique et de la dialyse du RNA	55
(δ) Rôle de la température d'extraction : possibilité de formation d'agrégats dans la méthode d'extraction à chaud	56
(ε) Dissolution et conservation du RNA	60
d) Facteurs intervenant dans l'analyse par centrifugation en gradient de saccharose, des RNA à marquage rapide	60
(α) Conditions expérimentales	60
(β) Résultats	61
DISCUSSION	66
CONCLUSION	68

	Page
B. SYNTHÈSE PROTÉIQUE IN VITRO EN PRÉSENCE DES RNA MESSAGERS DES ANIMAUX NORMAUX OU HYPOPHYSECTOMISÉS ..	70
CHAPITRE VI :	
MISE AU POINT ET CARACTÉRISTIQUES DE FONCTIONNE- MENT D'UN SYSTÈME DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE ACELLULAIRE DE FOIE DE RAT	70
1. Préparation des fractions subcellulaires en- trant dans la composition des systèmes acel- lulaires	71
a) Principe	71
b) Modalités techniques	71
2. Description des différents systèmes utilisés..	75
a) Système microsomal	75
(α) Microsomes	75
(β) Fraction enzymatique	79
(γ) Conditions d'incubation	80
(δ) Conditions de préincubation	81
(ε) Mesure de la radioactivité incorpo- rée	82
(ζ) Dosage des protéines et des RNA des suspensions	84
b) Système acellulaire brut "S-20"	84
c) Système "Ribosomal" et "Polysomal"	85
(α) Méthode de préparation des riboso- mes par déprotéinisation au déso- xycholate	86
(β) Méthode d'isolement des polysomes libres	86
3. Étude critique des facteurs influençant le fonc- tionnement du système microsomal	87
a) Influence de la concentration en microso- mes sur l'activité propre	88

	Page
b) Influence de la concentration en surnageant 105.000 g sur l'activité propre ...	88
c) Cinétique de l'incorporation des aminoacides dans les protéines due au RNA messenger endogène	90
d) Rôle de l'incubation et de la préincubation : comparaison de l'activité propre et de la stimulation par le Poly U	92
(α) Activité propre des microsomes	94
(β) Activité additionnelle du système non préincubé en présence de Poly U	94
(γ) Activité du système préincubé en présence de Poly U	95
e) Influence du pH du milieu d'incubation ..	98
f) Influence de la concentration en Mg^{++} et en K^{+}	100
g) Influence de l'ATP et du système générateur d'ATP	103
h) Effet synergique du système générateur d'énergie et des ions Mg^{++}	105
i) Influence de la congélation des microsomes	107
j) Influence du suc nucléaire	109

CHAPITRE VII :

ACTIVITES DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE DES SYSTÈMES ACÉLULAIRES SOUS L'INFLUENCE DE DIVERS RNA MESSAGERS..	112
1. Activités du système microsomal	112
a) Etude de l'incorporation de divers aminoacides sous l'influence du RNA messenger endogène	112

	Page
b) Stimulation de l'incorporation de divers aminoacides par des polynucléotides synthétiques	114
(α) Acide polyuridylique	114
(β) Acide polycytidylique-uridylique ..	116
(γ) Acide polyadénylique-uridylique-cytidylique	116
c) Stimulation de l'incorporation des aminoacides sous l'influence de RNA messagers naturels	119
(α) Nature des RNA étudiés	120
(β) Activité additionnelle du système microsomal non préincubé en présence de RNA messagers naturels	121
(γ) Activité du système microsomal préincubé en présence de RNA messagers naturels	127
(δ) Etude de l'influence de certains facteurs expérimentaux sur la stimulation par les mRNA naturels	129
2. Activité des autres systèmes acellulaires	133
a) Activité du système acellulaire brut "S-20"	134
b) Activités des systèmes "ribosomal" et "polysomal"	134
DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS	136

CHAPITRE VIII :

COMPARAISON DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE DANS LE SYSTÈME MICROSOMAL DE FOIE DE RATS NORMAUX, HYPOPHYSECTOMISÉS ET TRAITÉS À L'HORMONE DE CROISSANCE	139
1. Aspects cytologique ultrastructural des foies et des préparations microsomales	139
a) Etude cytologique des foies	139

	Page
b) Aspect des préparations microsomales	139
2. Activité du système microsomal de foie de rats hypophysectomisés et traités à l'hormone de croissance	142
a) Activité des systèmes non préincubés	142
b) Activité additionnelle des systèmes non préincubés, en présence de poly U	144
c) Activité des systèmes à composition croisée	144
3. Conclusions	146
 DEUXIEME PARTIE	
RECHERCHES SUR LES RNA DE TRANSFERT DU FOIE DE RATS NORMAUX ET HYPOPHYSECTOMISES	147
INTRODUCTION	147
A. ESSAI DE MISE EN EVIDENCE DE DIFFERENCES AU NIVEAU DES tRNA	150
 CHAPITRE IX :	
PREPARATION ET ANALYSE DES RNA DE TRANSFERT DU FOIE DE RAT	150
1. Préparation des RNA de transfert	150
a) Préparation par action du phénol à froid à partir du surnageant 105.000 g	150
b) Préparation par action du phénol à froid à partir du surnageant postmitochondrial.	151
c) Préparation par action du phénol à froid puis à chaud à partir d'un broyat cellulaire	152

	Page
d) Purification des préparations de sRNA ...	152
(α) Traitement au méthylcellosolve	152
(β) Traitement par un sel d'ammonium quaternaire	153
(γ) Chromatographie sur colonne de DEAE cellulose	153
(δ) Détachement des aminoacides	153
2. Capacité acceptrice des RNA de transfert	154
a) Préparation enzymatique permettant la fi- xation des aminoacides aux tRNA	154
b) Test de l'activité acceptrice des tRNA ..	155
3. Influence de la méthode d'extraction sur le rendement et l'activité acceptrice des prépa- rations de tRNA	156
4. Influence de l'origine de la préparation enzyma- tique sur la capacité acceptrice du tRNA	159
5. Préparation et séparation chromatographique des 14C et 3H aminoacyl-tRNA	160
a) Préparation de 14C ou de 3H aminoacyl- tRNA	160
b) Séparation chromatographique des amino- cyl-tRNA	161
(α) Préparation de la phase organique..	162
(β) Préparation de la colonne	162
(γ) Expression des résultats	163

CHAPITRE X :

COMPARAISON DES RNA DE TRANSFERT DES FOIES DE RATS NORMAUX ET HYPOPHYSECTOMISES	164
1. Comparaison des capacités acceptrices des tRNA de foie de rats normaux et hypophysectomisés..	164
a) Mise en évidence d'une diminution de la capacité acceptrice chez les tRNA des foies de rats hypophysectomisés	164

	Page
b) Etude de certains facteurs pouvant expliquer la diminution de la capacité acceptrice chez les tRNA de foie de rats hypophysectomisés	166
(α) Conditions optimales de fixation de l'arginine	166
(β) Fixation des aminoacides sur les tRNA dans les conditions permettant le réattachement du triplet terminal pCpCpA	168
(γ) Essais de renaturation des tRNA ...	170
2. Comparaison des profils de fractionnement chromatographique des tRNA de foie de rats normaux et hypophysectomisés	171
 B. ESSAI DE MISE EN EVIDENCE DE DIFFERENCES AU NIVEAU DES ENZYMES DE FIXATION : Comparaison des capacités acceptrices des tRNA en présence d'enzymes de foie de rats normaux ou hypophysectomisés	174
 DISCUSSION	175
DISCUSSION GENERALE	179
RESUME	189
BIBLIOGRAPHIE	194
LISTE DES ABREVIATIONS	200



